



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Área de concentração: Ciência de Alimentos

**CONVERSÃO DE CASCA DA AMÊNDOA DE CACAU, CASCA DE TAMARINDO E
ORA-PRÓ-NÓBIS EM β -MANANASE, COM APLICAÇÃO EM PROCESSOS DE
SACARIFICAÇÃO E NA PRODUÇÃO DE PÃO SEM GLÚTEN**

Autora: Luise de Oliveira Sena

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Franco

ITAPETINGA
BAHIA- BRASIL

2026

LUISE DE OLIVEIRA SENA

**CONVERSÃO DE CASCA DA AMÊNDOA DE CACAU, CASCA DE TAMARINDO E
ORA-PRÓ-NÓBIS EM β -MANANASE, COM APLICAÇÃO EM PROCESSOS DE
SACARIFICAÇÃO E NA PRODUÇÃO DE PÃO SEM GLÚTEN**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos.

Autor: M.Sc. Luise de Oliveira Sena

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Franco

Co- orientadoras: Dr^a. Fabiane Neves Silva

Dr^a. Eliseth de Souza Viana

ITAPETINGA

BAHIA- BRASIL

2026

664.752
S477c

Sena, Luise de Oliveira.

Conversão de casca da amêndoa de cacau, casca de tamarindo e ora-pró-nóbis em β -mananase, com aplicação em processos de sacarificação e na produção de pão sem glúten. / Luise de Oliveira Sena. – Itapetinga-BA: UESB, 2026.

174f.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Marcelo Franco e coorientação da D. Sc. Fabiane Neves Silva e da D. Sc. Eliseth de Souza Viana.

1. Pão sem glúten – Fermentação em estado sólido. 2. Resíduos agroindustriais – Fermentação em estado sólido - Biomassa. 3. Enzimas – Produção - Extrato bruto multienzimático. 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. Silva, Fabiane Neves. IV. Viana, Eliseth de Souza. V. Título.

CDD (21): 664.752

Catálogo na Fonte:

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

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Resíduos agroindustriais – Bioprodutos – Alimentos funcionais

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “CONVERSÃO DE CASCA DA AMÊNDOA DE CACAU, CASCA DE TAMARINDO E ORA-PRÓ-NÓBIS EM β MANANASE, COM APLICAÇÃO EM PROCESSOS DE SACARIFICAÇÃO E FORMULAÇÕES PANIFICÁVEIS SEM GLÚTEN”

Autor (a): LUISE DE OLIVEIRA SENA

Orientador (a): Prof. Dr. Marcelo Franco

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.

Documento assinado digitalmente
 **JANAINA SILVA DE FREITAS PEREIRA**
Data: 13/04/2026 11:22:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Janaína Silva de Freitas
(UESB)

Documento assinado digitalmente
 **GRAZIELLY DE JESUS SILVA GONCALVES**
Data: 09/04/2026 15:40:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Grazielly de Jesus Silva
(UESB)

Documento assinado digitalmente
 **CRISTIANE PATRICIA DE OLIVEIRA**
Data: 13/04/2026 17:22:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Cristiane Patrícia de Oliveira
(UESB)

Documento assinado digitalmente
 **RONIELLI CARDOSO REIS**
Data: 01/04/2026 14:54:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Ronielli Cardoso Reis
(EMBRAPA)

Documento assinado digitalmente
 **MARCELO FRANCO**
Data: 09/04/2026 14:50:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Itapetinga-BA, 31 de março de 2026.

AGRADECIMENTOS

Muito antes de iniciar esta jornada, entreguei meus planos ao Senhor em oração, pedindo que a vontade d'Ele prevalecesse. Eu estava exausta, física e emocionalmente. Lembro-me com clareza daquela madrugada, em que, entre lágrimas, questionei se este novo caminho era, de fato, o que eu deveria seguir. E, em meio à incerteza, fui acolhida por sinais que, aos poucos, confirmaram: sim, esta era a minha estrada. A partir daquele momento, mesmo ciente das dificuldades que viriam, encontrei paz na certeza de que não estaria sozinha. Deus sempre estaria comigo.

Esta conquista representa a realização de um sonho, de uma menina que, anos atrás, via esse momento como algo quase inalcançável. Hoje, celebro o encerramento de um ciclo repleto de desafios, mas também de vitórias, aprendizados e amadurecimento. Com gratidão e o coração leve, celebro não apenas um título, mas todo o caminho percorrido até aqui.

Nada disso seria possível sem o apoio incondicional de pessoas especiais. À Deus, minha eterna gratidão, por conduzir meus passos, me fortalecer nas fraquezas, ouvir minhas orações angustiadas e me acalmar com Sua presença. Por me permitir caminhar em lugares que jamais imaginei pisar, e celebrar conquistas antes tão distantes. Obrigada, Senhor, por iluminar o meu caminho com a sua luz e me preencher com seu amor.

À minha família, meu alicerce. À minha mãe, Maria da Glória, pelo amor incansável, pelas orações silenciosas, pelos conselhos sábios e por nunca soltar a minha mão. Ao meu pai, Valdelino, por sua calma, apoio constante e presença desde o princípio. À minha irmã, Grazielle, por ser porto seguro, amiga e por me dar os presentes mais lindos, Valentina e Luma, que encheram meus dias de sorrisos e o coração de amor. À minha avó, Maria José, pelo carinho e suporte de sempre. Vocês são os meus bens mais preciosos, e esta conquista também é vocês. Lutamos juntos e vencemos. Amo vocês infinitamente!

Ao meu namorado, Matheus, por todo o amor, carinho e apoio constante, especialmente por me tranquilizar nos dias mais agitados.

Ao meu orientador, Prof. Marcelo Franco, por me desafiar a sair da zona de conforto, pela paciência, pelos conselhos firmes e pela valiosa troca de conhecimento. Aprendi imensamente ao longo desses anos e levarei seus ensinamentos como referência para minha vida profissional.

À Fabiane, coorientadora e amiga de todas as horas, por compartilharmos tantos momentos e por tornar essa caminhada mais leve.

Aos amigos do Laboratório de Biotransformação e Biocatálise Orgânica (LaBioCat), por todo apoio, conhecimentos compartilhados, e por tornarem o dia a dia mais leve com tantas risadas, conversas, cafés e comilanças.

À Drª Eliseth Viana, por me acompanhar desde o início da minha vida acadêmica, ainda no ensino médio. Sou eternamente grata por toda a orientação recebida ao longo desses anos e pelas palavras de encorajamento, incentivo e carinho.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura, pela oportunidade de realizar parte desta pesquisa na instituição.

Aos membros do Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos (LCTA), pelo suporte e apoio na execução dos experimentos.

Ao professor Renato Souza Cruz (UEFS), pela disponibilidade e pelo auxílio na realização de parte das análises.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (PPGECAL), pela oportunidade de desenvolver o doutorado, bem como pela assistência e estrutura oferecidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento da bolsa de pesquisa.

Aos amigos de caminhada, que não citarei nomes para não me esquecer de alguém, meu carinho especial. Obrigada por torcerem por mim e celebrarem cada passo.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este sonho se tornasse realidade, o meu mais sincero agradecimento. Esta vitória também é de vocês.

*“Quem caminha sozinho pode até chegar rápido, mas aquele
que vai acompanhado, com certeza vai mais longe”.*

Autor desconhecido

*“Para que todos vejam, e saibam, e considerem, e juntamente
entendam que a mão do Senhor fez isso” (Isaías 41:20).*

*Dedico este trabalho à minha família,
por ser a minha fonte inesgotável de força,
fé e amor.*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
CAPÍTULO II.....	10
CAPÍTULO III	11
CAPÍTULO IV	11
LISTA DE TABELAS	12
CAPÍTULO II.....	13
CAPÍTULO III	13
CAPÍTULO IV	14
LISTA DE ABREVIACÕES.....	16
CAPÍTULO I.....	16
CAPÍTULO II.....	16
CAPÍTULO III	17
CAPÍTULO IV	18
RESUMO	19
ABSTRACT.....	20
CAPÍTULO I.....	21
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	19
2. OBJETIVOS	22
2.1. Geral	22
2.2. Específicos.....	22
CAPÍTULO II	23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
3.1. Resíduos agroindustriais e biomassa lignocelulósica	24
3.1.1. Principais componentes da biomassa lignocelulósica	25
3.2. Enzimas degradadoras de manana	28
3.2.1. β -Mananase: mecanismo de ação, estrutura e classificação	29
3.2.1.1. Aplicações industriais da β -mananase	30
3.3. Fermentação em estado sólido (FES)	31
3.3.1. <i>Penicillium roqueforti</i> : Características e potencial enzimático	36
3.4. Conversão enzimática de biomassa para produção de biocombustíveis	38
3.4.1. Biorrefinarias e geração de bioenergia	38
3.4.2. Sacarificação enzimática de resíduos lignocelulósicos	40

3.5. Aspectos gerais de diversos resíduos agroindustriais/biomassa	41
3.5.1. Casca da amêndoa de cacau.....	41
3.5.2. Casca de tamarindo.....	45
3.5.3. Ora-pró-nóbis.....	48
3.5.4. Palha de milho	52
4. Glúten e doença celíaca	55
5. Mercado de produtos sem glúten.....	57
5.1. Pão sem glúten.....	58
6. Estratégias tecnológicas aplicadas à pães sem glúten.....	60
6.1. Hidrocolóides.....	62
6.2. Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).....	62
6.3. Enzimas.....	63
7. Farinha de banana verde	64
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
REFERÊNCIAS	69
CAPÍTULO III.....	96
Abstract	99
1. Introduction	99
2. Materials e methods	102
2.1. Lignocellulosic biomass	102
2.2. Preparation of <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC10110 inoculum	102
2.3. Solid state fermentation	102
2.3.1. Multivariate optimization	103
2.3.2. Determination of β -mannanase enzymatic activity	103
2.4. Biochemical characterization.....	104
2.4.1. Optimum pH and pH stability.....	104
2.4.2. Thermostability.....	104
2.4.3. Effect of salts and organic compounds.....	104
2.4.4. Effect of solvents	105
2.4.5. Halotolerance	105
2.5. Enzymatic saccharification of corn straw	105
2.5.1. Scanning electron microscopy	105
2.5.2. Fourier Transform Infrared Spectroscopy-FTIR	106
3. Results and discussion.....	106

3.1. Lignocellulosic biomass	106
3.2. Multivariate optimization	107
3.3. Biochemical characterization.....	114
3.3.1. Optimum pH and pH stability.....	114
3.3.2. Thermostability.....	116
3.3.3. Effect of salts and organic compounds.....	117
3.3.4. Effect of solvents	120
3.3.5. Halotolerance	122
3.4. Saccharification	124
3.4.1. Scanning electron microscopy	126
3.4.2. Fourier Transform Infrared Spectroscopy –FTIR.....	126
4. Conclusion.....	129
References	131
CAPÍTULO IV	139
Resumo	141
1. Introdução.....	142
2. Metodologia	143
2.1. Produção do extrato bruto multienzimático	143
2.2. Atividades enzimáticas do extrato bruto multienzimático	144
2.2.1. Celulase e amilase	144
2.2.2. β -mananase.....	144
2.2.3. Xilanase	144
2.2.4. Protease	144
2.2.5. Lacase.....	145
2.2.6. Manganês peroxidase	145
2.3. Produção dos pães	145
2.3.1. Matéria-prima.....	145
2.3.2. Análise instrumental da cor e composição centesimal da farinha de banana verde.....	145
2.3.3. Produção dos pães sem glúten à base de farinha de banana verde.....	146
2.4. Caracterização dos pães sem glúten	147
2.4.1. Volume, volume específico e densidade	147
2.4.2. Análise sensorial.....	147
2.4.3. Análise instrumental da cor e composição centesimal dos pães sem glúten.....	148
2.5. Análise estatística	148

2.6. Resultados e discussão	148
2.6.1. Atividades enzimáticas do extrato bruto multienzimático	148
2.6.2. Análise instrumental da cor e composição centesimal da farinha de banana verde.....	150
2.6.3. Volume, volume específico e densidade dos pães	151
2.6.4. Análise sensorial.....	153
2.6.5. Cor da crosta e miolo dos pães	159
2.6.6. Composição centesimal.....	160
2.7. Conclusões.....	162
Referências.....	162

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1- Principais componentes da biomassa lignocelulósica.....	25
Figura 2- Representação esquemática de diferentes tipos de manana	28
Figura 3- Ilustração das principais estruturas de mananas e das enzimas envolvidas em sua degradação.	29
Figura 4- Visualização da estrutura tridimensional da β -mananase, mostrando o domínio catalítico tipo (β/α) 8. As α -hélices estão representadas em vermelho e as fitas β em amarelo.....	30
Figura 5- Comparação entre fermentação submersa e fermentação em estado sólido..	32
Figura 6- (a) Mistura de biomassas (casca da amêndoa de cacau, casca de tamarindo e ora-pró-nóbis) para fermentação em estado sólido; (b) Mistura de biomassas fermentadas pelo fungo <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110; (c) Vista superior da biomassa fermentada.	32
Figura 7- Etapas da fermentação em estado sólido.....	34
Figura 8- <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110 cultivado em meio BDA.	37
Figura 9- Morfologia característica de <i>P. roqueforti</i> sob microscopia óptica: presença de hifas septadas, conidióforos ramificados e conídios pigmentados.	37
Figura 10- Partes do fruto do cacau.	42
Figura 11- Valor da produção de cacau no Brasil de 2019-2023.	42
Figura 12- Resíduo da casca da amêndoa do cacau seca e moída (2mm)	43
Figura 13- Vagem de tamarindo e suas composições; (a) vagem, (b) polpa, (c) casca, (d) semente, (e) testa e (f) caroço.	46
Figura 14- Resíduo da casca de tamarindo seca moída (2mm)..	47
Figura 15- Pó de ora-pro-nóbis obtido após secagem e trituração das folhas..	49
Figura 16- Principais regiões produtoras de milho no mundo em 2023.	53
Figura 17- Dez maiores produtores de milho em 2023.....	53
Figura 18- Resíduo da palha de milho seca e moída (2mm).....	54
Figura 19- Estrutura do glúten.	56
Figura 20- Danos estruturais das vilosidades do intestino delgado causados pela doença celíaca...57	
Figura 21- Estrutura da hidroxipropilmetilcelulose.....	63
Figura 22- Principais regiões produtoras de banana no mundo em 2024.	65
Figura 23- Ranking dos cinco maiores produtores de banana no mundo em 2024..	65
Figura 24- Processo de obtenção da farinha de banana verde.	66

CAPÍTULO III

Fig. 1 Standardized effect for the investigated factors (a) and contour plot obtained from the quadratic model (b)	110
Fig. 2 Standardized effect for the investigated factors (a) and contour plot obtained from the quadratic model (b)	113
Fig. 3 (a) β -mannanase activity by <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110 under solid-state fermentation at different pH (b) pH stability profile	115
Fig. 4 Thermal stability profile of β -mannanase produced under solid-state fermentation using <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110	116
Fig. 5 Evaluation of corn straw saccharification using β -mannanase produced by <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110 under solid-state fermentation.....	124
Fig. 6 Scanning electron microscopy (SEM) analysis of corn straw after the saccharification process. a) Control; b) Residue after saccharification with enzymatic blend	126
Fig. 7 FTIR spectrum of Raw Corn Husk (CH) and Saccharified Corn Husk (SCH).....	127

CAPÍTULO IV

Figura 1- Imagem da crosta (a) e fatias (b) dos pães sem glúten, à base de farinha de banana verde (FBV). F1- Pão FBV e água; F2- Pão com FBV e extrato bruto multienzimático (EMB); F3- Pão com FBV, água e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) a 6%; F4- Pão com FBV, EBM e HPMC (6%).....	153
Figura 2- a) Média hedônica da aceitação da aparência externa de pães sem glúten, produzidos à base de farinha de banana verde (FBV). Médias hedônicas (n = 61), obtidas em escala de nove pontos, variando de “gostei muitíssimo” (9) a “desgostei muitíssimo” (1) nos extremos da escala. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p > 0,05). b) Aprovação (notas ≥ 6) das formulações. F1- Pão com FBV e água; F2- Pão com FBV e extrato bruto multienzimático (EBM); F3- Pão com FBV, água e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) a 6%; F4- Pão com FBV, EBM e HPMC (6%).	154
Figura 3- Intenção de compra dos pães sem glúten, produzidos com farinha de banana verde, com base na avaliação da aparência externa. F1- Pão com FBV e água; F2- Pão com FBV e extrato bruto multienzimático (EBM); F3- Pão com FBV, água e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) a 6%; F4- Pão com FBV, EBM e HPMC (6%).	155
Figura 4- Escala do ideal para os atributos de cor (a) e textura (b) de pães sem glúten, à base de farinha de banana verde (FBV). F1- Pão com FBV e água; F2- Pão com FBV e extrato bruto	

multienzimático (EBM); F3- Pão com FBV, água e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) a 6%; F4- Pão com FBV, EBM e HPMC (6%). 157

Figura 5- Intenção de compra dos pães sem glúten, produzidos com farinha de banana verde após o consumo. F1- Pão com FBV e água; F2- Pão com FBV e extrato bruto multienzimático (EBM); F3- Pão com FBV, água e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) a 6%; F4- Pão com FBV , EBM e HPMC (6%). 158

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1- Composição de diversas biomassas lignocelulósicas	26
Tabela 2- Produção β -mananase por fermentação em estado sólido a partir de resíduos agroindustriais com diferentes microrganismos.	33
Tabela 3- Diferentes enzimas produzidas por fermentação em estado sólido utilizando o fungo filamentoso <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110.	38
Tabela 4- Rendimento de açúcares fermentescíveis obtido pela ação da β -mananase sobre diferentes biomassas lignocelulósicas.....	40
Tabela 5- Produtos/aplicações tecnológicas de derivados da casca da amêndoa de cacau reportadas na literatura.	44
Tabela 6- Produtos/aplicações de derivados dos resíduos de tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)....	47
Tabela 7- Produtos/aplicações da ora-pró-nóbis (<i>Pereskia aculeata</i> Mill.).....	50
Tabela 8- Produtos/aplicações da palha de milho.	54
Tabela 9- Pães sem glúten produzidos a partir de diferentes matérias-primas.	59
Tabela 10- Diferentes classes de aditivos utilizados para melhorar a qualidade de produtos sem glúten.....	60
Tabela 11- Diferentes aplicações da farinha de banana verde.	67

CAPÍTULO III

Table 1. Physicochemical composition of different agro-industrial residues and biomass. Experiments were performed in triplicate, and values are presented as mean $\pm$ standard deviation.	106
Table 2. Mixture design matrix with constraints, showing the coded and actual values (in parentheses) for β -mannanase production by <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110 under solid-state fermentation, along with the experimental responses for enzymatic activity (U g^{-1}). Experiments were performed in triplicate, and values are presented as mean $\pm$ standard deviation.	108
Table 3. Analysis of variance for the quadratic model obtained in the mixture design.....	109
Table 4. Doehlert design matrix with the coded and actual values (in parentheses) for the independent variables (factors) initial moisture (A, %) and incubation temperature (B, $^{\circ}\text{C}$), considering the dependent variable (response) as the enzymatic activity (U g^{-1}). Experiments were performed in triplicate, and values are presented as mean $\pm$ standard deviation.	111
Table 5. Analysis of variance for the quadratic model obtained in the mixture design.....	112

Table 6. Relative activity of β -mannanase produced by solid-state fermentation using 5.5 g of a mixture of cocoa bean shell, Ora-pro-nobis, and tamarind peel with <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110 in the presence of different salts and organic compounds. The activity of the crude enzymatic extract without additives was considered 100% (control). Reaction conditions: metal salt concentration: 2 mmol L ⁻¹ ; temperature: 50 °C; reaction time: 5 min. Experiments were performed in triplicate, and values are presented as mean $\pm$ standard deviation.....	118
Table 7. Relative activity of β -mannanase produced by solid-state fermentation using 5.5 g of a mixture of cocoa bean shell, Ora-pro-nobis, and tamarind peel with <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110 in the presence of different organic solvents. The activity of the crude enzymatic extract without additives was considered 100% (control). Reaction conditions: solvent concentrations: 10, 20, 30, and 40%; temperature: 50 °C; reaction time: 5 min. Experiments were performed in triplicate, and values are presented as mean $\pm$ standard deviation.....	120
Table 8. Relative activity of β -mannanase produced by solid-state fermentation using 5.5 g of a mixture of cocoa bean shell, Ora-pro-nobis, and tamarind peel with <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110 in the presence of different NaCl concentrations. The activity of the crude enzymatic extract without additives was considered 100% (control). Reaction conditions: NaCl concentrations: 0.01, 0.05, 1, 2, 3, 4, 5, and 6 M; temperature: 50 °C; reaction time: 5 min. Experiments were performed in triplicate, and values are presented as mean $\pm$ standard deviation.....	122

CAPÍTULO IV

Tabela 1- Ingredientes e proporções utilizadas nas formulações dos pães sem glúten, à base de farinha de banana verde.	146
Tabela 2- Atividade das diferentes enzimas presentes no extrato bruto multienzimático produzidas a partir da mistura de casca da amêndoa de cacau, ora-pró-nóbis e casca de tamarindo por fermentação em estado sólido, utilizando o fungo <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110.	149
Tabela 3- Características físico-químicas e composição centesimal da farinha de banana verde (variedade BRS Terra Anã).....	150
Tabela 4- Volume, volume específico e densidade dos pães sem glúten, elaborados à base de farinha de banana verde.	151

Tabela 5- Médias hedônicas e percentuais de aprovação dos atributos cor, aroma, sabor e textura dos pães sem glúten, à base de farinha de banana verde.....	155
Tabela 6- Análise de cor da crosta e do miolo dos pães sem glúten, à base de farinha de banana verde.....	159
Tabela 7- Composição centesimal dos pães sem glúten, à base de farinha de banana verde.	160

LISTA DE ABREVIACÕES

CAPÍTULO I

BL- Biomassa lignocelulósica

CAC- Casca da amêndoa de cacau

CT- Casca de tamarindo

EBM- Extrato bruto multienzimático

FDA- Food and Drug Administration (Administração de Alimentos e Medicamentos)

FES- Fermentação em estado sólido

GRAS- Geralmente Reconhecido Como Seguro

OPN- Ora-pró-nóbis

PM- Palha de milho

CAPÍTULO II

1G- Combustíveis de Primeira Geração

2G- Combustíveis de Segunda Geração

3G- Combustíveis de Terceira Geração

4G- Combustíveis de Quarta Geração

AE- Atividade Enzimática

AF- Açúcares Fermentescíveis

AR- Açúcares redutores

AR- Amido resistente

BL- Biomassa lignocelulósica

CAC- Casca da amêndoa de cacau

CAGR- Compound Annual Growth Rate (Taxa de Crescimento anual Composta)

CF- Condições de fermentação

CO₂- Dióxido de carbono

CS- Condições de sacarificação

DC- Doença celíaca

FAO- Food and Agriculture Organization (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)

FBV- Farinha de banana verde

FDA- Food and Drug Administration (Administração de Alimentos e Medicamentos)

FES- Fermentação em estado sólido

GH- Glicosil hidrolase

GRAS- Geralmente Reconhecido Como Seguro

HPMC- Hidroxipropilmetilcelulose

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ODS- Objetivos do Desenvolvimento Sustentável

OPN- Ora-pró-nóbis

PANCs- Plantas alimentícias não convencionais

BDA- Potato Dextrose Agar (Batata Dextrose Ágar)

PSG- Produtos sem glúten

CAPÍTULO III

ADF- Acid detergent fiber

ADF-acid detergent fiber

CBS- Cocoa bean shell

CP-crude protein

CS-Corn straw

DD-Doehlert design

DF-degrees of freedom

DMF- N-dimethylformamide

DMSO- dimethyl sulfoxide

DNS- 3,5- dinitrosalicyic acid

EA-enzymatic activity

EB-enzyme *blend*

EDTA- ethylene-diaminetetraacetic acid

FTIR-Fourier Transform Infrared Spectroscopy

HD-humidity

HPLC-High Performance Liquid Chromatography

MD-mixture design

MOS-mannooligosaccharides

MS- mean squares

NDF- Neutral detergent fiber

NDF-neutral detergent fiber

OPN-Ora-pro-nóbis

SEM-Scanning Electron Microscopy

SS- Sum of squares

SSF -solid-state fermentation

T- Tamarind peel

TP-temperature

CAPÍTULO IV

AR- Amido resistente

CMC- Carboximetilcelulose

DNS- 3,5- ácido dinitrosalicílico

DNS- Ácido 3,5 dinitrossalicílico

EBM- Extrato bruto multienzimático

FBV- Farinha de banana verde

FES- Fermentação em estado sólido

FBV- Farinha de banana verde

HPMC- Hidroxipropilmetilcelulose

PSG- Produtos sem glúten

TCLE- Termo de consentimento livre e esclarecido

U- Unidade de atividade enzimática

VCT- Valor calórico total

SENA, L. DE O. “**Conversão de casca da amêndoa de cacau, casca de tamarindo e ora-pró-nóbis em β -mananase, com aplicação em processos de sacarificação e na produção de pão sem glúten**”. Itapetinga – BA: UESB, 2026. (Tese – Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos-Área de concentração em Ciência de Alimentos) *

RESUMO

A busca por soluções sustentáveis e tecnologicamente inovadoras tem impulsionado o aproveitamento de resíduos agroindustriais como matéria-prima para a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado. Nesse cenário, a fermentação em estado sólido (FES) destaca-se como estratégia eficiente para a produção de enzimas aplicáveis tanto à conversão de biomassa lignocelulósica quanto ao aprimoramento de sistemas alimentares. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi produzir um extrato bruto multienzimático (EBM) contendo β -mananase por FES, e avaliou sua versatilidade na sacarificação de biomassa lignocelulósica e na formulação de pão sem glúten. A produção enzimática foi conduzida com *Penicillium roqueforti* ATCC 10110, sendo otimizada por planejamento simplex-centroid, que definiu como proporção ideal 73,28% de casca da amêndoa de cacau, 17,64% de ora-pro-nóbis e 9,09% de casca de tamarindo. As condições ideais de fermentação, determinadas por matriz Doehlert, foram 22 °C, 69% de umidade e 7 dias, resultando em atividade de 104,27 U/g. O extrato apresentou características bioquímicas interessantes, com pH ótimo de 6,0, estabilidade térmica a 50 °C, halotolerância (até 6 M NaCl) e aumento de atividade na presença de CuSO₄ (7,74%) e acetona (77,16%). Na aplicação em biomassa lignocelulósica, o extrato promoveu a liberação de 133,29 mg/g de açúcares redutores a partir da palha de milho em 5 horas de reação. Análises por microscopia eletrônica de varredura e FTIR confirmaram alterações estruturais e despolimerização da matriz vegetal, evidenciando o potencial do sistema para processos de biorrefinaria. O extrato bruto multienzimático (EBM) (104,27 U/g de β -mananase) foi também aplicado para formulação de pães sem glúten produzidos com farinha de banana verde (cultivar BRS Terra Anã). Embora o uso isolado do extrato não tenha promovido melhorias estruturais expressivas, sua associação com o hidrocolóide revelou efeito sinérgico significativo ($p < 0,05$). A formulação contendo EBM e 6% de hidroxipropilmetilcelulose apresentou maior volume (178,61 mL), maior volume específico (2,56 mL/g), menor densidade (390,09 kg/m³) e maior umidade (47,63%), além de coloração de crosta mais próxima ao padrão convencional de panificação. Sensorialmente, destacou-se para aceitação global (7,0), 90% de aprovação, percepção de textura e cor próximas ao ideal e índices expressivos de intenção de compra (67,2% visual e 57,3% pós-consumo). Conclui-se que o EBM produzido por FES a partir de resíduos agroindustriais apresenta dupla aplicabilidade estratégica, atuando de forma eficiente na conversão eficiente de biomassa lignocelulósica quanto na superação dos gargalos tecnológicos da panificação sem glúten. Esta abordagem integrada demonstra a viabilidade de bioprocessos inovadores para os setores de biorrefinaria e alimentos funcionais.

Palavras-chave: Pão sem glúten, fermentação em estado sólido, hidrólise enzimática, farinha de banana verde.

* Orientador: Prof. Dr. Marcelo Franco e Coorientadoras: Dr^a. Fabiane Neves Silva e Dr^a. Eliseth de Souza Viana.

SENA, L. de O. “**Conversion of cocoa bean shell, tamarind shell, and ora-pro-nóbis into β -mannanase, with application in saccharification processes and in the production of gluten-free bread**”. Itapetinga – BA: UESB, 2026. (Thesis – Doctorate in Food Science and Engineering – Area of concentration in Food Science)*.

ABSTRACT

The search for sustainable and technologically innovative solutions has driven the use of agro-industrial residues as raw materials for the production of high value-added bioproducts. In this context, solid-state fermentation (SSF) has emerged as an efficient strategy for enzyme production, with applications in both lignocellulosic biomass conversion and the improvement of food systems. Therefore, the aim of this study was to produce a crude multienzymatic extract (CME) containing β -mannanase through SSF and evaluate its versatility in lignocellulosic biomass saccharification and gluten-free bread formulation. Enzyme production was carried out using *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 and optimized through a simplex-centroid design, which established the ideal substrate composition as 73.28% cocoa bean shell, 17.64% ora-pro-nóbis, and 9.09% tamarind shell. The optimal fermentation conditions determined by the Doehlert matrix were 22 °C, 69% moisture, and 7 days, resulting in an enzymatic activity of 104.27 U/g. The extract exhibited promising biochemical characteristics, including an optimum pH of 6.0, thermal stability at 50 °C, halotolerance (up to 6 M NaCl), and increased activity in the presence of CuSO₄ (7.74%) and acetone (77.16%). In the lignocellulosic biomass application, the extract promoted the release of 133.29 mg/g of reducing sugars from corn stover after 5 h of reaction. Scanning electron microscopy and FTIR analyses confirmed structural changes and depolymerization of the plant matrix, highlighting the potential of this enzymatic system for biorefinery processes. The crude multienzymatic extract (104.27 U/g of β -mannanase) was also applied in the formulation of gluten-free bread produced with green banana flour (BRS Terra Anã cultivar). Although the isolated use of the extract did not promote significant structural improvements, its combination with hydrocolloid showed a significant synergistic effect ($p < 0.05$). The formulation containing CME and 6% hydroxypropyl methylcellulose exhibited higher loaf volume (178.61 mL), higher specific volume (2.56 mL/g), lower density (390.09 kg/m³), and higher moisture content (47.63%), in addition to a crust color closer to that of conventional bakery products. Sensory evaluation also demonstrated promising results, including overall acceptance (7.0), 90% approval, texture and color perception close to the ideal standard, and expressive purchase intention indices (67.2% before consumption and 57.3% after consumption). In conclusion, the CME produced by SSF using agro-industrial residues demonstrated dual strategic applicability, acting efficiently both in lignocellulosic biomass conversion and in overcoming technological challenges associated with gluten-free breadmaking. This integrated approach highlights the feasibility of innovative bioprocesses for biorefinery and functional food applications.

Keywords: Gluten-free Bread; Solid-State Fermentation; Enzymatic Hydrolysis; Green Banana Flour.

*Orientador: Prof. Dr. Marcelo Franco e Coorientadoras: Dr^a. Fabiane Neves Silva e Dr^a. Eliseth de Souza Viana.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO GERAL

A crescente geração de resíduos agroindustriais, associada à necessidade de práticas produtivas mais sustentáveis, tem impulsionado o desenvolvimento de tecnologias voltadas ao aproveitamento eficiente da biomassa. Estima-se que bilhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos sejam produzidas anualmente a partir de atividades agrícolas e industriais, representando não apenas um desafio ambiental, mas também uma oportunidade para a geração de produtos de maior valor agregado (KUMAR *et al.*, 2025; LIU *et al.*, 2023). Quando adequadamente processados, esses materiais podem ser convertidos em diferentes bioprodutos, como biocombustíveis, compostos bioativos e enzimas industriais, contribuindo para o fortalecimento de cadeias produtivas baseadas na bioeconomia (ANDOH-MENSAH *et al.*, 2023; YOUNES; KARBOUNE, 2023).

Entre esses resíduos destacam-se a casca da amêndoa de cacau (CAC), a casca de tamarindo (CT) e a palha de milho (PM), subprodutos frequentemente descartados pela agroindústria, apesar de apresentarem composição rica em polissacarídeos estruturais, que os tornam promissores para aplicação em bioprocessos (ALMEIDA LESSA *et al.*; SOARES; OLIVEIRA, 2022; CHINTA *et al.*, 2025). A PM, em especial, apresenta elevada disponibilidade e composição favorável à conversão enzimática, contendo aproximadamente 42,1% de celulose, 21,9% de hemicelulose e 26,9% de lignina (LU *et al.*, 2024), características que contribuem para a obtenção de açúcares fermentescíveis para aplicações em biorrefinarias (YU *et al.*, 2024). Apesar do elevado potencial tecnológico, grande parte desses resíduos ainda é subutilizada ou descartada inadequadamente no ambiente, reforçando a necessidade de estratégias sustentáveis voltadas à sua valorização.

Adicionalmente, a ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) (OPN), planta alimentícia não convencional reconhecida pelo elevado teor proteico (HOFF *et al.*, 2022), surge como alternativa promissora para suplementação de meios fermentativos, podendo atuar como fonte natural de nitrogênio e nutrientes essenciais ao crescimento microbiano (ZHANG *et al.*, 2025) e à síntese de enzimas extracelulares (ALVES *et al.*, 2022).

Entre as alternativas biotecnológicas para o aproveitamento dessa biomassa, a fermentação em estado sólido (FES) tem recebido atenção crescente, especialmente pela possibilidade de utilizar resíduos lignocelulósicos como substrato e fonte de nutrientes para microrganismos produtores (ZOU *et al.*, 2024; PERWEZ; AL ASHEH, 2025). Este bioprocessos, conduzido em meios com reduzida atividade de água, mimetiza o habitat natural de fungos filamentosos e apresenta vantagens como menor geração de efluentes, elevada produtividade, baixo consumo energético (SINGHANIA *et al.*, 2009; ARYA *et al.*, 2022).

Nesse contexto, o fungo *Penicillium roqueforti* vem demonstrando potencial para a produção de diferentes enzimas de interesse industrial a partir de biomassas residuais, incluindo β -glicosidase (DAS NEVES *et al.*, 2022; CHAVES *et al.*, 2025) lipase (SALES DE MENEZES *et al.*, 2021), xilanase (RIBEIRO *et al.*, 2025; SOUZA *et al.*, 2018) e endoglucanase (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Além do potencial biotecnológico, esse microrganismo pode ser classificado como GRAS (Generally Recognized as Safe) pela Food and Drugs Administration (FDA), característica que favorece sua aplicação em processos destinados à indústria de alimentos (SOUZA *et al.*, 2018).

Dentre as enzimas produzidas por FES, destaca-se a β -mananase (EC 3.2.1.78), uma hemicelulase capaz de hidrolisar ligações β -1,4-manosídicas presentes nas mananas, promovendo a despolimerização da hemicelulose e a liberação de açúcares fermentescíveis e oligossacarídeos de interesse industrial (VAN ZYL *et al.*, 2010; ROY CHOUDHURY; DAS; CHAKRABORTY, 2024). Além das aplicações na conversão de biomassa lignocelulósica, essa enzima também vem sendo empregada na indústria alimentícia, incluindo processos de clarificação de sucos (ZHAO *et al.*, 2020) e na produção de oligossacarídeos prebióticos (WANG *et al.*, 2025).

Dentro do setor alimentício, destaca-se a aplicação de enzimas no desenvolvimento de produtos de panificação sem glúten, impulsionada pela crescente demanda por alimentos com melhor qualidade tecnológica e sensorial (SADEGHIAN MOTAHAR *et al.*, 2021; SUTRISNO *et al.*, 2025). A produção de pães sem glúten, entretanto, ainda representa um desafio tecnológico devido à ausência do glúten, responsável pela formação da rede viscoelástica que promove retenção de gases e confere estrutura à massa. Como consequência, esses pães frequentemente apresentam baixo volume específico, textura inadequada e rápida perda de qualidade durante o armazenamento (MORREALE *et al.*, 2018; RONDON *et al.*, 2021).

Em razão disso, as enzimas têm sido amplamente investigadas como estratégia para melhorar as propriedades tecnológicas e sensoriais desses produtos, uma vez que atuam em diferentes componentes da massa, promovendo maior estabilidade estrutural e melhoria da textura do produto final (DAHIYA *et al.*, 2020). No entanto, embora diversos estudos tenham avaliado a aplicação de enzimas purificadas em produtos panificados sem glúten (SADEGHIAN MOTAHAR *et al.*, 2021; SUTRISNO *et al.*, 2025; ALIZADEH-BAHAABADI *et al.*, 2022), ainda são escassos os relatos sobre o uso de extratos brutos multienzimáticos (EBM) obtidos por FES nesse tipo de aplicação.

Entre as matérias-primas utilizadas na elaboração de produtos sem glúten, a farinha de banana verde apresenta elevado teor de amido resistente, composto que atua fisiologicamente de maneira semelhante às fibras alimentares e apresenta potencial prebiótico. Seu consumo está associado a benefícios fisiológicos relacionados à saúde intestinal e metabólica (TRIBESS *et al.*, 2009; AGAMA-ACEVEDO *et al.*, 2012).

Diante desse contexto, a integração entre a produção de enzimas a partir de resíduos agroindustriais e sua aplicação em alimentos surge como abordagem promissora para o desenvolvimento de processos mais sustentáveis e inovadores. Assim, esta pesquisa teve como objetivo produzir um EBM contendo β -mananase por FES utilizando *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 a partir de uma mistura da CAC, CT e OPN como matéria-prima, bem como avaliar sua aplicação na hidrólise da PM e sua influência nas propriedades tecnológicas de pão sem glúten.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Produzir um extrato bruto contendo β -mananase a partir de resíduos agroindustriais e ora-pro-nóbis por fermentação em estado sólido, otimizar as condições de produção, investigar suas propriedades bioquímicas e avaliar seu potencial na hidrólise da palha de milho e na melhoria das propriedades tecnológicas de pão sem glúten à base de farinha de banana verde.

2.2. Específicos

- Preparar e caracterizar quimicamente os resíduos agroindustriais (casca da amêndoa de cacau, ora-pro-nóbis, casca de tamarindo e palha de milho);
- Otimizar a produção do extrato bruto contendo β -mananase por fermentação em estado sólido (FES) a partir de utilizando uma mistura de resíduos agroindustriais (cascas da amêndoa de cacau e) e ora-pro-nóbis;
- Avaliar o potencial do extrato bruto contendo β -mananase na sacarificação da palha de milho;
- Avaliar o potencial do extrato bruto contendo β -mananase na produção e fermentação de pães sem glúten, à base farinha de banana verde;

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Resíduos agroindustriais e biomassa lignocelulósica

A Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre as Alterações Climáticas (CQNUAC) define a biomassa como a “matéria orgânica não fossilizada e biodegradável originada de plantas, animais e microrganismos”, incluindo “produtos, subprodutos e resíduos da agricultura, silvicultura e indústrias relacionadas, bem como as frações orgânicas não fossilizadas e biodegradáveis de resíduos industriais e municipais”. Entre os diversos tipos de biomassa, a biomassa lignocelulósica (BL) tem se destacado pela sua ampla disponibilidade, baixo custo e caráter renovável (BARAKA *et al.*, 2025).

Reconhecida como o recurso vegetal mais abundante da Terra, a BL é considerada uma das alternativas mais promissoras para a substituição de matérias-primas fósseis. Seu apelo ecológico, associado à ampla distribuição geográfica e ao custo reduzido, tem despertado o interesse crescente da indústria moderna. A BL pode ser classificada em quatro categorias principais: biomassa florestal, culturas energéticas, resíduos domésticos e resíduos agrícolas. Dentre estas, os resíduos agrícolas e urbanos representam, respectivamente, cerca de 27% e 30% da geração global de biomassa, sendo as frações mais expressivas em termos de volume (SUNAR *et al.*, 2025).

Relatórios recentes indicam que a produção global de resíduos poderá atingir 2,59 bilhões de toneladas até 2030, com tendência contínua de crescimento. No caso específico dos setores alimentício e agrícola, estima-se que aproximadamente 33% dos alimentos destinados ao consumo humano sejam perdidos ao longo da cadeia de suprimentos, o que corresponde a cerca de 1,6 bilhão de toneladas por ano. Esses dois setores, inclusive, lideram a geração de resíduos industriais, com estimativas apontando que em 2025 sejam responsáveis por cerca de 44% dos resíduos e subprodutos globais (CHAVAPRADIT *et al.*, 2025). O acúmulo descontrolado desses resíduos, especialmente os agrícolas, representa sérios riscos ambientais. Quando descartados sem tratamento adequado, esses materiais contribuem para a emissão de gases de efeito estufa, agravando o cenário das mudanças climáticas e favorecendo a formação de subprodutos potencialmente tóxicos. Esse descarte inadequado compromete a qualidade do solo, da água e do ar, colocando em risco a saúde humana e a estabilidade dos ecossistemas (RAJA *et al.*, 2025).

Diante desse panorama, a valorização da BL surge como uma alternativa estratégica. A BL pode ser convertida em compostos químicos e bioprodutos de interesse industrial por meio de rotas físicas, químicas, enzimáticas ou microbianas, atendendo a setores diversos como alimentos, energia, fármacos, materiais e químicos industriais (VINUTHANA *et al.*, 2025).

3.1.1. Principais componentes da biomassa lignocelulósica

Estruturalmente, a BL é constituída majoritariamente por polímeros como celulose (30-60%), hemicelulose (20-40%) e lignina (15-25%), que compõem sua matriz complexa e resistente (Figura 1).

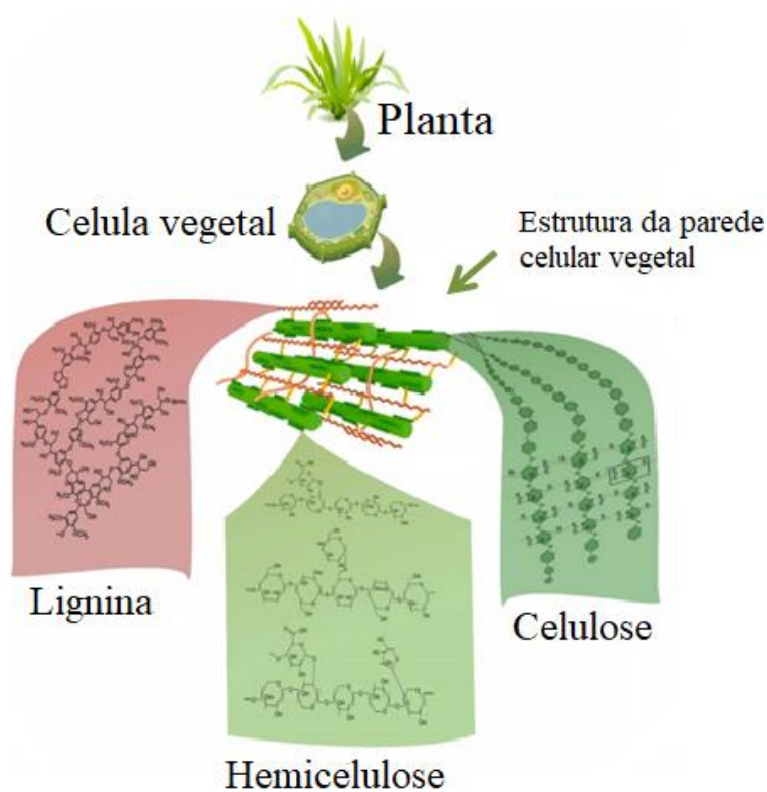


Figura 1- Principais componentes da biomassa lignocelulósica. **Fonte:** Adaptado de KUKRETI; KUMAR; KATARIA, 2024.

Contudo, a proporção relativa desses constituintes lignocelulósicos podem variar em função da origem botânica e das características físico-químicas da biomassa utilizada, conforme exhibe a Tabela 1.

Tabela 1- Composição de diversas biomassas lignocelulósicas

Materiais lignoceleulósicos	Celulose (%)	Hemicelulos e (%)	Lignina (%)	Referência
Casca de algodão	42,95	30,66	18,57	SAMOMSSA <i>et al.</i> , 2024
Palha de arroz	32,33	37,66	20,12	SAMOMSSA <i>et al.</i> , 2024
Espiga de milho	29,97	44,66	15,57	SAMOMSSA <i>et al.</i> , 2024
Bagaço de cevada	33,7	39,7	14,3	OLIVEIRA MONTEIRO <i>et al.</i> , 2021
Bagaço de cana-de-açúcar	41,45	36,14	22,01	AITA <i>et al.</i> , 2019
Casca de café	25,7	14,6	17,6	CERDA <i>et al.</i> , 2017
Casca da amêndoa de cacau	27,15	6,6	21,8	ALMEIDA LESSA <i>et al.</i> , 2023
Palha de sorgo	28,64	18,27	5,47	QIAN <i>et al.</i> , 2024
Bagaço de maçã	22,64	18,24	5,47	PANIAGUA-GARCÍA <i>et al.</i> , 2024
Palha de trigo	30,6	22,9	18,8	DENG <i>et al.</i> , 2025
Folha de abacaxi	46,19	21,34	10,59	SHARMA <i>et al.</i> , 2025
Palha de milho	49,7	29,5	12,0	DU <i>et al.</i> , 2024
Palha de colza	28,4	15,3	17,7	ZHU <i>et al.</i> , 2023

A celulose é um polímero linear de glicose unidas por ligações β -1,4-glicosídicas, cujas cadeias organizam-se em microfibrilas altamente cristalinas devido a intensas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (LI *et al.*, 2024). Cada molécula apresenta uma extremidade

redutora com grupo hemiacetal e uma extremidade não redutora com o C₁ envolvido na ligação glicosídica (HOUFANI *et al.*, 2020). As microfibrilas, com diâmetro entre 2 e 20 nm e comprimento de até 40.000 nm, resultam da simetria estrutural promovida pela rotação das unidades de glicose, que distribui uniformemente os grupos —OH, permitindo a formação de feixes paralelos. Esses se agrupam em fibrilas e, posteriormente, em fibras de celulose (KUMAR *et al.*, 2025). A complexidade hierárquica dessa estrutura confere alta estabilidade química e resistência mecânica, dificultando sua degradação (VINUTHANA *et al.*, 2025).

A hemicelulose é um polímero estrutural relevante na biomassa lignocelulósica, distinguindo-se da celulose por sua composição heterogênea. É formada por monossacarídeos como xilose, manose, galactose, arabinose, ácido galacturônico e ácidos glicurônicos, organizados em anéis de furanose e piranose. Essas unidades são conectadas principalmente por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 e, em menor grau, β -1,3 (SUNAR *et al.*, 2025). A hemicelulose apresenta um grau de polimerização consideravelmente menor que o da celulose (variando de 80 a 200 unidades), o que resulta em cadeias mais curtas e com estrutura predominantemente amorfa. Essa característica confere à hemicelulose maior susceptibilidade à hidrólise química e enzimática, devido ao seu menor peso molecular e ausência de regiões cristalinas bem definidas. Além disso, esse polímero se liga fortemente à superfície das microfibrilas de celulose por meio de interações não covalentes, contribuindo para a estabilidade estrutural da parede celular vegetal (VINUTHANA *et al.*, 2025).

A lignina é um polímero aromático amplamente presente na natureza, conhecido por sua hidrofobicidade, resistência à degradação microbiana e papel essencial na rigidez das paredes celulares vegetais (SUNAR *et al.*, 2025)). Trata-se de um composto fenólico de estrutura amorfa, cuja biossíntese ocorre por meio da via fenilpropanóide, a partir dos monolignóis p-cumarílico, coniferílico e sinapílico. Esses precursores são incorporados por ligações do tipo éter e carbono-carbono, originando uma rede tridimensional densa e altamente recalcitrante (MARGELLOU *et al.*, 2023). Associada de forma estreita à celulose e hemicelulose, a lignina forma ligações éter com ambos os polímeros e ligações éster especificamente com a hemicelulose. Essas interações contribuem para a formação de uma matriz altamente estável, que dificulta o acesso enzimático aos carboidratos estruturais. Essa barreira recalcitrante torna necessário o uso de pré-tratamentos para romper a estrutura lignocelulósica, reduzir a cristalinidade da celulose e ampliar a área superficial disponível à ação enzimática (VINUTHANA *et al.*, 2025).

A robustez da matriz lignocelulósica decorre das interações complexas entre seus biopolímeros, unidas por ligações covalentes e de hidrogênio, além da cristalinidade da celulose e da natureza hidrofóbica da lignina. Essa estrutura dificulta sua conversão em bioprodutos, sendo uma das principais barreiras nos processos de biorrefinaria. Por isso, são necessários pré-

tratamentos eficientes e economicamente viáveis para fracionar a biomassa e viabilizar sua transformação (BARAKA *et al.*, 2025).

3.2. Enzimas degradadoras de manana

A manana é um dos polissacarídeos mais relevantes presentes na hemicelulose. Estão amplamente presentes em tecidos vegetais como madeira, tubérculos, sementes e leguminosas (MALGAS; VAN DYK; PLETSCHE, 2015). As mananas podem ser classificadas em diferentes tipos, com base na composição e na organização dos monossacarídeos que formam suas cadeias (MALGAS; VAN DYK; PLETSCHE, 2015). A manana linear é formada exclusivamente por unidades de D-manose ligadas por ligações β -1,4. A glucomanana, por sua vez, contém resíduos de D-manose e D-glicose distribuídos ao longo da cadeia principal, mantendo as ligações β -1,4. Já a galactomanana apresenta uma cadeia de manose com ramificações laterais de D-galactose ligadas por ligações α -1,6. Por fim, a galactoglucomanana apresenta uma estrutura mais complexa, composta por D-manose, D-glicose e D-galactose (Figura 2) (VAN ZYL *et al.*, 2010).

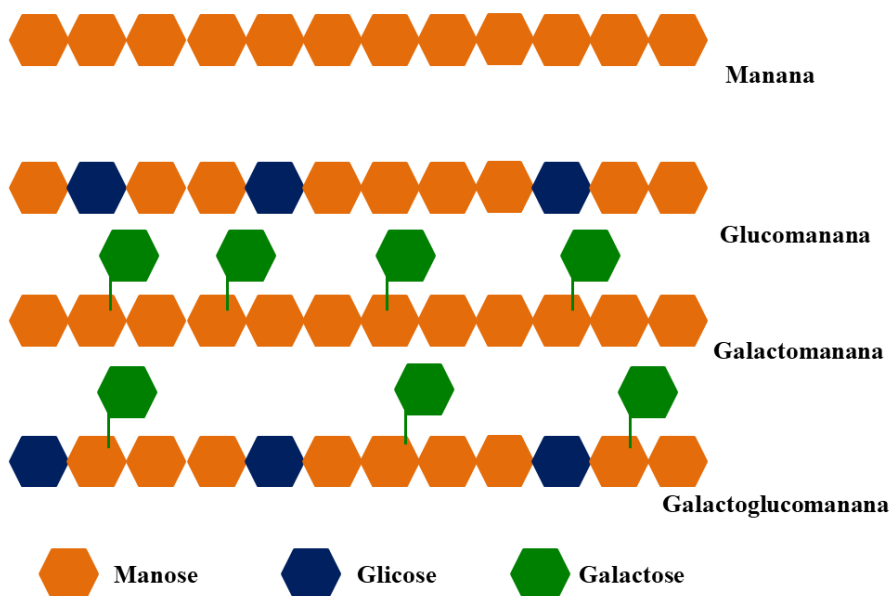


Figura 2- Representação esquemática de diferentes tipos de manana. **Fonte:** Adaptado de JANA; PANDEY; KANGO, 2025.

A complexidade estrutural das mananas requer a ação sinérgica de diversas enzimas hidrolíticas. As principais incluem: a β -mananase (EC 3.2.1.78), que atua de forma endo-hidrolítica clivando ligações internas da cadeia principal; a β -manosidase (EC 3.2.1.25), que remove resíduos de manose a partir da extremidade não redutora dos oligossacarídeos; e a β -glicosidase (EC

3.2.1.21), que completa a conversão dos produtos intermediários em glicose. Enzimas acessórias, como a α -galactosidase (EC 3.2.1.22) e a acetil manano esterase (EC 3.1.1.6), são igualmente necessárias para a remoção de grupos laterais, como galactose e acetil, aumentando a acessibilidade da cadeia principal à hidrólise (Figura 3) (VAN ZYL *et al.*, 2010).

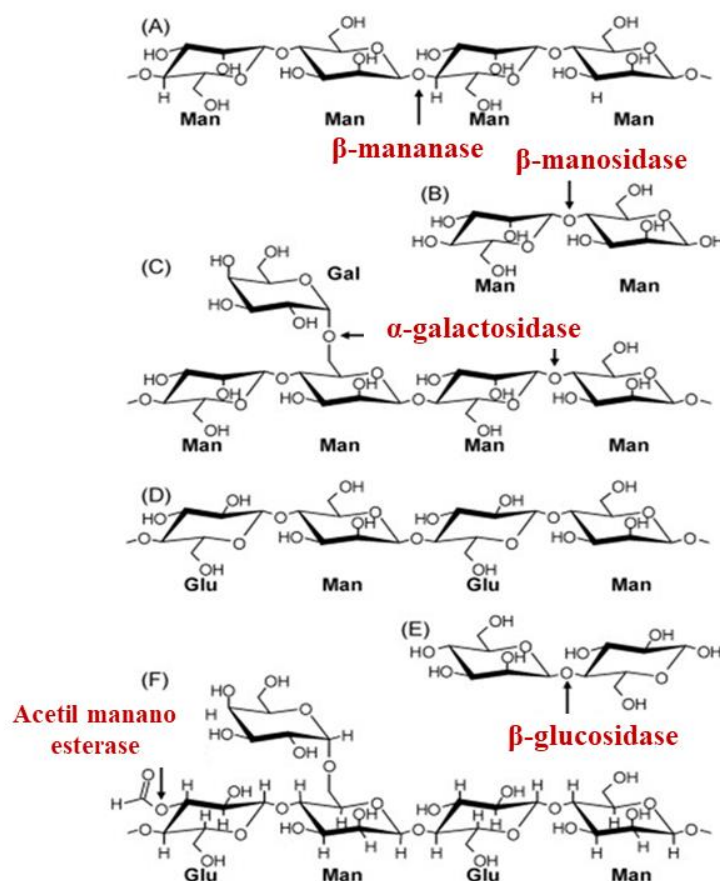


Figura 3- Ilustração das principais estruturas de mananas e das enzimas envolvidas em sua degradação. **Fonte:** Adaptado de VAN ZYL *et al.*, 2010.

3.2.1. β -Mananase: mecanismo de ação, estrutura e classificação

A β -mananase, ou endo-1,4- β -mananase, destaca-se como a enzima-chave na iniciação do processo hidrolítico. Sua ação catalítica promove a clivagem aleatória das ligações β -1,4 na cadeia de manose, liberando oligossacarídeos de cadeia curta e criando novas extremidades acessíveis à ação de outras enzimas (MALGAS; VAN DYK; PLETSCHKE, 2015). De acordo com o banco de dados CAZy, a β -mananase pertence às famílias de glicosil hidrolases GH5, GH26 e GH113 (<https://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>). Essas enzimas apresentam um domínio catalítico típico do clã GH-A, com dobra estrutural em barril (β/α) 8, e mecanismo catalítico

baseado em duplo deslocamento com retenção da configuração anomérica (CHAUHAN *et al.*, 2012). No caso das β -mananases fúngicas, há predominância da família GH5, com menor representação na GH26. Estudos de cristalografia revelam que o sítio ativo dessas enzimas apresenta uma fenda aberta, contendo resíduos de glutamato altamente conservados, localizados nas fitas $\beta 4$ e $\beta 7$, responsáveis pelas funções de ácido/base e nucleófilo, respectivamente (VAN ZYL *et al.*, 2010).

A representação tridimensional da β -mananase é apresentada na Figura 4.

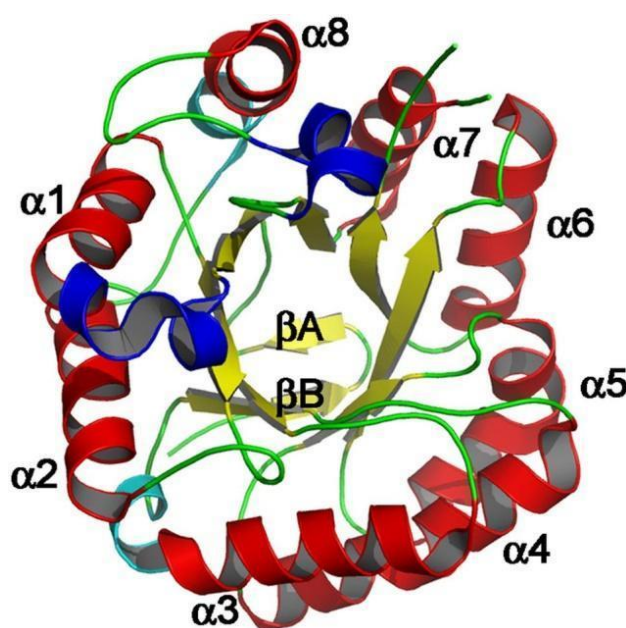


Figura 4- Visualização da estrutura tridimensional da β -mananase, mostrando o domínio catalítico tipo (β/α) 8. As α -hélices estão representadas em vermelho e as fitas β em amarelo. **Fonte:** (DAWOOD; MA, 2020).

3.2.1.1. Aplicações industriais da β -mananase

A β -mananase é uma enzima versátil com ampla aplicabilidade industrial devido à sua capacidade de degradar mananas presentes em diferentes substratos vegetais. Ela tem sido utilizada em diversos setores, incluindo detergentes, onde atua na remoção de resíduos orgânicos (DAVID *et al.*, 2018); na indústria alimentícia, para clarificação de sucos (ZHAO *et al.*, 2020) e produção de oligossacarídeos prebióticos (WANG *et al.*, 2025a) ; e na nutrição animal, sendo adicionada a dietas de frangos de corte (YU *et al.*, 2025; BAREKATAIN *et al.*, 2024), galinhas poedeiras (KIARIE *et al.*, 2025) e peixes para melhorar a digestibilidade e a saúde intestinal (DA CRUZ *et al.*, 2024b) .

Além disso, a enzima é empregada em bioprocessos para a sacarificação de resíduos lignocelulósicos (COSTA *et al.*, 2023) e no biobranqueamento de polpa vegetal, contribuindo para a redução do uso de produtos químicos no setor de papel e celulose (PATEL; DUDHAGARA, 2020). Na engenharia ambiental, a β -mananase tem sido aplicada na reciclagem de materiais estabilizados com biopolímeros (MUGUDA; WYNDHAM, 2024), e também no setor de petróleo, como agente biológico para redução da viscosidade de soluções poliméricas em ambientes industriais de baixa temperatura (YOU *et al.*, 2016).

3.3. Fermentação em estado sólido (FES)

A β -mananase microbiana pode ser produzida por fermentação submersa ou em estado sólido, sendo esta última frequentemente mais vantajosa em termos de custo e rendimento (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2017). A FES tem se destacado como uma estratégia biotecnológica eficiente e alinhada aos princípios da bioeconomia circular, especialmente pela sua capacidade de valorizar resíduos agroindustriais de forma ambiental e economicamente viável (KUKRETI; KUMAR; KATARIA, 2024). Ao empregar microrganismos capazes de crescer sobre matrizes sólidas lignocelulósicas, a FES viabiliza a conversão de subprodutos de baixo custo em compostos de alto valor agregado, como enzimas, biocatalisadores e outros metabólitos com aplicação em diferentes setores industriais. Essa abordagem, além de promover a valorização de resíduos, contribui significativamente para a redução dos custos de produção, o que reforça sua viabilidade técnica e econômica em escala industrial (PERWEZ; AL ASHEH, 2025).

O potencial desses resíduos está fortemente relacionado à sua composição química, frequentemente rica em carbono, nitrogênio e frações lignocelulósicas (celulose, hemicelulose e lignina), que são metabolizadas pelos microrganismos ao longo do processo fermentativo (PERWEZ; AL ASHEH, 2025). Esses substratos não apenas fornecem os nutrientes necessários ao crescimento microbiano, mas também atuam como suporte físico, favorecendo a aderência e a colonização dos microrganismos, principalmente em sistemas de FES. A FES é definida como um processo no qual os microrganismos se desenvolvem sobre substratos sólidos umedecidos, em condições com baixa atividade de água, diferindo da fermentação submersa, que utiliza meios líquidos com alta atividade de água (Figura 5) (KHASWAL *et al.*, 2024).

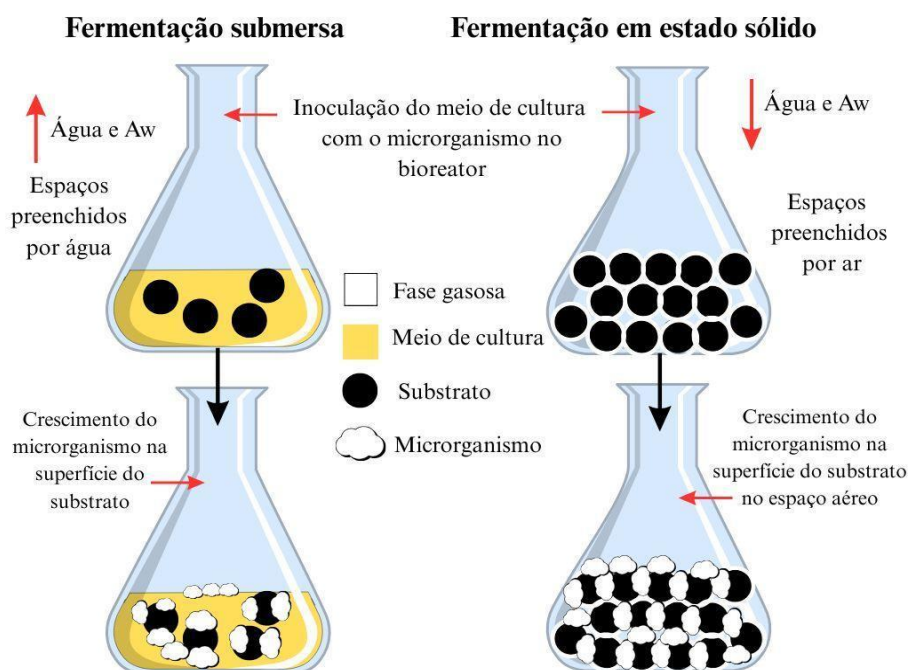


Figura 5- Comparação entre fermentação submersa e fermentação em estado sólido. **Fonte:** Adaptado de GARRIDO-GALAND *et al.*, 2021.

A FES é especialmente favorável ao cultivo de fungos filamentosos, como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Trichoderma*, já que a técnica mimetiza seu ambiente natural e também possuem elevada capacidade de colonizar matrizes sólidas e sintetizar eficientemente enzimas extracelulares (ARYA *et al.*, 2022) (Figura 6). A escolha do microrganismo ideal para FES, no entanto, depende de múltiplos fatores, como sua adaptação ao substrato, produtividade enzimática, tolerância a variações de temperatura e pH, facilidade de manipulação genética e segurança do produto final para uso em aplicações industriais ou alimentares (YAFETTO, 2022).

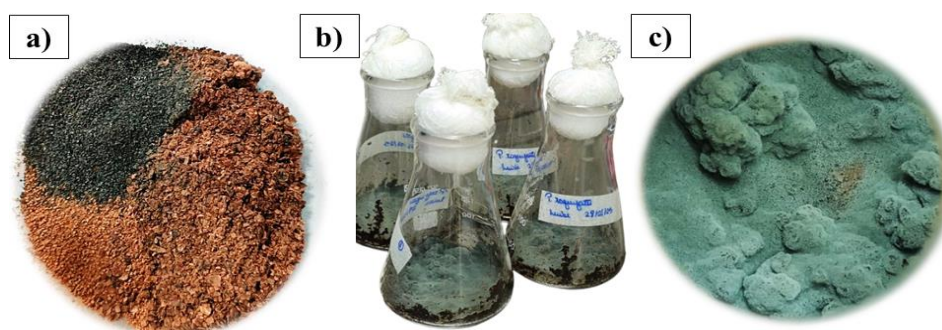


Figura 6- (a) Mistura de biomassas (casca da amêndoa de cacau, casca de tamarindo e ora-pró-nóbis) para fermentação em estado sólido; (b) Mistura de biomassas fermentadas pelo fungo *P. roqueforti* ATCC 10110; (c) Vista superior da biomassa fermentada. **Fonte:** A autora.

Como exemplificado na Tabela 2, diversos estudos relataram a produção de β -mananase por FES a partir de diferentes resíduos agroindustriais e microrganismos.

Tabela 2- Produção β -mananase por fermentação em estado sólido a partir de resíduos agroindustriais com diferentes microrganismos.

Resíduo	Microrganismo	CF	AE	Referências
Mistura de resíduos de torta de palmiste e farelo de soja	<i>Penicillium acculeatum</i> APS1	U: 52,25% Tempo: 130 h T: 30 °C	4696 U/g	BANGORIA; DIVECHA; SHAH, 2021
Farelo de trigo	<i>Bacillus nealsonii</i> PN-11	pH 8 T: 37 °C	834 Ug	DAVID <i>et al.</i> , 2018
Torta de palmiste	<i>Aspergillus terreus</i> FBCC 1369	U: 12,8 mL pH 8 T: 37 °C Tempo: 5 dias	417 U/g	SONI <i>et al.</i> , 2015
Mistura de resíduos de café, café moído e extrato de café	<i>Aspergillus sojae</i> AsT3 recombinante (ATCC 11906) e <i>Aspergillus niger</i> A42 (ATCC 204447)	pH 4,0 T: 30 °C Tempo: 7 dias	71,17 U/mg de proteína	BASMAK; TURHAN, 2024
Palha de arroz	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> RS1	pH 8 T: 30 °C Tempo: 13 dias	89,73 U/g	ISMAIL; HASSAN; EMRAN, 2019
Farelo de coco	<i>Malbranchea cinnamomea</i> NFCCI 3724	pH 7,75 U: 12,7 mL suplemento 86,7 mg	669 U/g	AHIRWAR <i>et al.</i> , 2016
Palha de arroz	<i>Pyrenophora phaeocomes</i>	U: 7,5 ml T: 28 °C Tempo: 4 dias	10,45 U/g	RASTOGI <i>et al.</i> , 2016

Cascas de batata secas	<i>A. niger</i> P - 19	U: 1:5 T: 28 °C Tempo: 5 dias	46,95 U/g	KAUR <i>et al.</i> , 2020
Casca de amendoim; farelo de trigo; casca de arroz; farelo de coco; torta de palmiste; palha de arroz	<i>Aspergillus tubingenses</i> NKBP-55	T: 30 °C Tempo: 5 dias	82,3 U/g 156,3 U/g 66,9 U/g 505,6 U/g 326,5 U/g 63,6 U/g, respectivam ente	PRAJAPATI <i>et al.</i> , 2020

CF- Condições de fermentação; AE- Atividade enzimática.

O processo de FES pode ser dividido em três etapas principais: *upstream*, *midstream* e *downstream* (Figura 7). A fase *upstream* compreende todas as preparações iniciais necessárias para garantir a viabilidade do processo, incluindo o pré-tratamento do substrato, sua esterilização, além da formulação do meio e da preparação do inóculo microbiano. Em seguida, a etapa *midstream* corresponde à fermentação propriamente dita, na qual os microrganismos são incubados com o substrato sólido sob condições controladas de temperatura, umidade e tempo, sendo essa fase crítica para a expressão máxima da atividade enzimática. Por fim, na etapa *downstream*, ocorre a recuperação do produto de interesse, envolvendo extração, purificação e, quando necessário, o acondicionamento do biocomposto para fins industriais ou comerciais (PERWEZ; AL ASHEH, 2025).

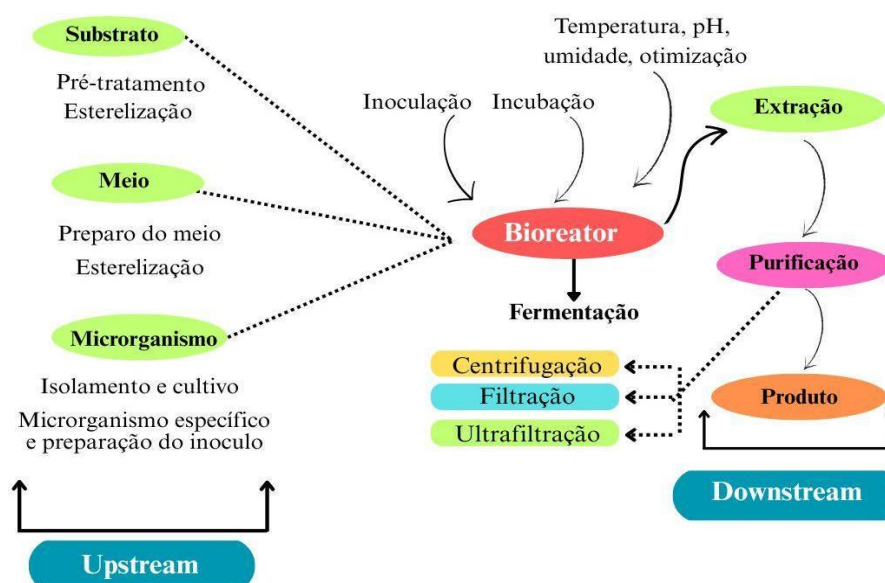


Figura 7- Etapas da fermentação em estado sólido. **Fonte:** Adaptado de YAFETTO, 2022.

A FES apresenta uma série de vantagens, como menor consumo de água e energia, menor produção de efluentes, e maior estabilidade das enzimas obtidas, devido à proteção oferecida pelo substrato sólido, o que as torna adequadas para aplicações em condições industriais adversas (PERWEZ; AL ASHEH, 2025). Outro aspecto relevante no contexto da FES é o uso de substratos mistos como estratégia para potencializar a produção enzimática. A combinação de diferentes fontes amplia o perfil nutricional do meio fermentativo e favorece interações sinérgicas entre componentes que atuam como indutores da atividade enzimática (LEITE; BELO; SALGADO, 2021).

Diversos estudos têm demonstrado o sucesso da FES utilizando diferentes combinações de resíduos agroindustriais e microrganismos. A combinação de manga, cacau e efluente líquido de óleo de palma com *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 tem sido utilizada na produção de lipase (DE MENEZES *et al.*, 2022). O mesmo fungo foi empregado na produção de exoglucanase a partir de uma mistura de casca de coco, sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar (DA SILVA NUNES *et al.*, 2020). Além disso, a produção conjunta de xilanases, celulasas e β -glicosidases tem sido realizada utilizando uma mistura de resíduo de azeite de oliva, bagaço de azeitona, bagaço de uva e brotos de poda de videira, com os fungos *Aspergillus ibericus* MUM 03.49 e *Aspergillus niger* CECT 2915 (FILIPE *et al.*, 2020).

Diversos fatores influenciam diretamente o desempenho da FES, sendo o tamanho das partículas, a umidade, a temperatura, o pH, a quantidade do inóculo e o tipo de substrato os mais relevantes. Partículas menores aumentam a área de contato para a ação microbiana, mas podem se aglomerar e prejudicar a aeração; já partículas maiores favorecem a troca gasosa, mas limitam a superfície disponível. A umidade adequada é essencial para a solubilização de nutrientes e o crescimento microbiano, enquanto teores excessivos reduzem a porosidade do substrato e dificultam a transferência de oxigênio (KUMAR *et al.*, 2021).

A temperatura, por sua vez, afeta o crescimento dos microrganismos e a estabilidade das enzimas, pois o acúmulo de calor metabólico pode comprometer o sistema. O pH também exerce influência significativa sobre a atividade enzimática, sendo afetado pelas reações metabólicas ao longo do processo, como a acidificação ocasionada pela liberação de ácidos orgânicos ou absorção de compostos que aumentem o pH (FARINAS, 2015). A quantidade do inóculo deve ser cuidadosamente ajustada, pois valores muito baixos retardam o início da fermentação, enquanto inóculos excessivos comprometem a transferência de massa e a produtividade (PERWEZ; AL ASHEH, 2025).

Por fim, o substrato deve fornecer nutrientes essenciais e atuar como suporte físico adequado. Uma fonte acessível de carbono, geralmente derivada da fração lignocelulósica, é fundamental para sustentar o crescimento fúngico ao longo da fermentação (WANG *et al.*, 2023).

3.3.1. *Penicillium roqueforti*: Características e potencial enzimático

O gênero *Penicillium* foi introduzido em 1809 por Johann Link para designar três espécies fúngicas com conidióforos que se assemelhavam a um pincel. Desde então, mais de 350 espécies foram descritas e classificadas como *Penicillium* spp. (AKANIRO *et al.*, 2023). Esses fungos pertencem ao filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, e ao subgênero *Penicillium* (SHEN *et al.*, 2025).

A importância desse gênero é histórica e científica, com destaque para a descoberta da penicilina, antibiótico que revolucionou o tratamento de infecções bacterianas, especialmente durante a Segunda Guerra Mundial. Além disso, *Penicillium* spp. compreendem um grupo diverso de fungos filamentosos amplamente distribuídos em ambientes naturais, substratos alimentares e até mesmo em condições extremas (AGRAWAL; CHAVAN; BADIGER, 2024).

Com distribuição global, os fungos do gênero *Penicillium* colonizam solos, vegetação, ambientes internos, ar atmosférico e uma variedade de alimentos. Seu papel ecológico está relacionado principalmente à decomposição de matéria orgânica, embora muitas espécies também sejam reconhecidas como importantes agentes fitopatogênicos e deterioradores de alimentos, com capacidade de produzir diversas micotoxinas. Por outro lado, algumas espécies são exploradas positivamente na indústria alimentícia, como na fabricação de queijos especiais, a exemplo do Camembert e do Roquefort (VISAGIE *et al.*, 2014).

Dentre as espécies de maior relevância tecnológica destaca-se o *Penicillium roqueforti*. Esse fungo apresenta características morfológicas variáveis quando cultivado em meio BDA (batata-dextrose-ágar), com colônias que podem exibir colorações que variam do cinza esverdeado claro ao escuro, incluindo tonalidades amareladas e verde-oliva, além de textura entre aveludada e fasciculada (Figura 8). A margem da colônia também pode variar significativamente entre cepas, ocupando desde uma faixa muito estreita até um terço do diâmetro total. A presença de exsudatos em forma de gotículas sobre a colônia também é frequentemente relatada (COTON *et al.*, 2020).



Figura 8- *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 cultivado em meio BDA. **Fonte:** A autora.

Microscopicamente, o micélio é denso, com conidióforos aveludados e estipes de 100 a 200 μm , com paredes rugosas. Os penicílios terminais apresentam fiálides geralmente terverticiladas, mas também podem ocorrer formas quaternionadas e, mais raramente, biverticiladas. As fiálides, em formato de frasco, originam colunas soltas de conídios esféricos, lisos e verde-escuros, com diâmetro entre 3 e 4,5 μm (Figura 9) (COTON *et al.*, 2020).

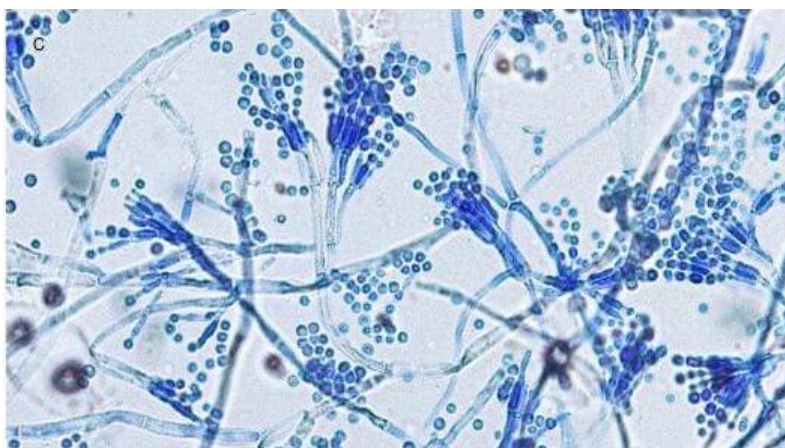


Figura 9- Morfologia característica de *P. roqueforti* sob microscopia óptica: presença de hifas septadas, conidióforos ramificados e conídios pigmentados. **Fonte:** Adaptado de COTON; JANY; COTON, 2022.

P. roqueforti possui características fisiológicas que o distinguem de outras espécies do gênero. Trata-se de um fungo microaerofílico, capaz de crescer em baixos níveis de oxigênio (até 5%) e em elevadas concentrações de CO_2 . Seu crescimento ótimo ocorre a 25 $^{\circ}\text{C}$, sendo inibido acima de 35 $^{\circ}\text{C}$, mas ainda viável a temperaturas tão baixas quanto 5 $^{\circ}\text{C}$. Em relação ao pH, pode crescer numa faixa ampla de 3,0 a 10,5, com pH ideal em torno de 6,0 (COTON *et al.*, 2020).

Essas características adaptativas tornam *P. roqueforti* um candidato versátil para aplicações biotecnológicas. Sua capacidade de crescer em meios com baixo pH, associada ao uso eficiente de pentoses e hexoses como fontes de carbono, amplia seu potencial em processos fermentativos industriais (MIOSO; TOLEDO MARANTE; HERRERA BRAVO DE LAGUNA, 2015). Além disso, o fungo é classificado como GRAS (Generally Recognized as Safe) pela Food and Drugs Administration (FDA), o que viabiliza seu uso seguro em aplicações alimentícias (SOUZA *et al.*, 2018).

O potencial de *P. roqueforti* na produção de enzimas extracelulares por fermentação em estado sólido é amplamente reconhecido e está exibido na Tabela 3.

Tabela 3- Diferentes enzimas produzidas por fermentação em estado sólido utilizando o fungo filamentoso *Penicillium roqueforti* ATCC 10110.

Resíduo	Enzima	Referência
Bagaço de cana-de-açúcar	Xilanase	SOUZA <i>et al.</i> , 2018
Casca de café	Xilanase	RIBEIRO <i>et al.</i> , 2025
Resíduo de cajá	Xilanase, endoglucanase, exoglucanase	DE ALMEIDA ANTUNES FERRAZ <i>et al.</i> , 2018
Casca da vagem de cacau	β -glicosidase	CHAVES <i>et al.</i> , 2025
Casca de cacau	Endoglucanase	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2018)
Casca de cacau	Lipase	SALES DE MENEZES <i>et al.</i> , 2021
Palma forrageira	β -glicosidase	DAS NEVES <i>et al.</i> , 2022
Casca de cacau, casca de café e casca de arroz	Lacase	SANTOS DA SILVA QUINTO <i>et al.</i> , 2025

3.4. Conversão enzimática de biomassa para produção de biocombustíveis

3.4.1. Biorrefinarias e geração de bioenergia

Ao longo do último século, a intensificação do uso de combustíveis fósseis contribuiu significativamente para o agravamento das emissões de gases de efeito estufa, além de provocar instabilidade no fornecimento energético e oscilações nos preços globais, especialmente no setor de transportes. Com o esgotamento progressivo dessas fontes não renováveis, torna-se urgente o

desenvolvimento de soluções energéticas ambientalmente sustentáveis (ROY CHOUDHURY; DAS; CHAKRABORTY, 2024). Nesse cenário, os combustíveis renováveis emergem como alternativa promissora, capazes de mitigar impactos ambientais e reduzir a dependência de combustíveis fósseis (DEL RÍO *et al.*, 2022).

A produção de biocombustíveis está inserida no conceito de biorrefinaria, o qual envolve a conversão integrada e sustentável da biomassa em energia, combustíveis e produtos de valor agregado, utilizando rotas físicas, químicas, bioquímicas e termoquímicas. Essa abordagem tecnológica se alinha a diversos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), especialmente, ao ODS 7 (energia acessível e limpa), ODS 8 (trabalho decente e crescimento econômico); ODS 9 (indústria, inovação e infraestrutura) e ODS 13 (ação contra a mudança do clima) (PATEL *et al.*, 2025).

Os biocombustíveis podem ser classificados conforme a origem da biomassa empregada. Os de primeira geração (1G) são obtidos a partir de matérias-primas comestíveis, como milho e cana-de-açúcar, o que acarreta competição com a produção de alimentos. Em contrapartida, os biocombustíveis de segunda geração (2G) utilizam biomassas não alimentares, como resíduos lignocelulósicos, promovendo maior sustentabilidade. Já a terceira geração (3G) explora a biomassa microbiana, com destaque para microalgas e macroalgas. Por fim, a quarta geração (4G) baseia-se na engenharia genética de microrganismos para otimizar a conversão de carbono em energia (BARUA *et al.*, 2023).

Devido à sua composição rica em carboidratos estruturais, como celulose, hemicelulose e lignina, a BL destaca-se como uma matéria-prima promissora para a produção de biocombustíveis de 2G. Estima-se que aproximadamente 70–75% dos carboidratos presentes nessas biomassas possam ser convertidos em açúcares fermentescíveis (AF), o que reforça seu valor como uma fonte economicamente viável e estratégica para processos biotecnológicos sustentáveis. No entanto, diferentemente das biomassas de primeira geração, a liberação eficiente de monossacarídeos, como a glicose, a partir da BL requer etapas intensivas de pré-tratamento, capazes de romper sua estrutura altamente recalcitrante (ROY CHOUDHURY; DAS; CHAKRABORTY, 2024).

Nesse contexto, a produção de biocombustíveis a partir de BLs fundamenta-se na conversão dos polissacarídeos estruturais da biomassa por meio de três etapas interdependentes: pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação. A integração desses processos viabiliza a obtenção de combustíveis renováveis, ao mesmo tempo em que contribui para a redução do uso de fontes fósseis (USMAN *et al.*, 2025). Dentre essas etapas, a sacarificação enzimática desempenha um papel importante na liberação de AF.

3.4.2. Sacarificação enzimática de resíduos lignocelulósicos

A sacarificação enzimática, ou hidrólise enzimática, constitui uma etapa-chave na bioconversão da BL em biocombustíveis, sendo responsável pela conversão dos polissacarídeos estruturais em açúcares simples (XU *et al.*, 2023b). Nesse processo, destacam-se as celulasas como as principais enzimas envolvidas. Uma vez adicionadas à biomassa, podem se adsorver à superfície do substrato por meio de seu módulo de ligação a carboidratos (CBM) ou diretamente pelo domínio catalítico, formando o complexo enzima-substrato. Inicialmente, a endoglucanase rompe ligações β -1,4-glicosídicas internas das regiões menos cristalinas da celulose, expondo as extremidades redutora e não redutora da cadeia polissacarídica e liberando oligossacarídeos. Na sequência, as exoglucanases (ou celobiohidrolases) atuam sobre essas extremidades, liberando celobiose ou cadeias curtas de glicose. Por fim, a β -glucosidase converte a celobiose em glicose, que é posteriormente utilizada pelos microrganismos fermentadores para produzir etanol (ROY CHOUDHURY; DAS; CHAKRABORTY, 2024).

A eficiência da sacarificação de BL está diretamente relacionada à atuação conjunta de celulasas e hemicelulasas, cuja combinação permite a degradação mais completa dos polissacarídeos estruturais. O uso de coquetéis enzimáticos que reúnem enzimas como β -xilosidases, endoxilanasas, α -arabino-furanosidase, acetoxilano esterase, β -mananase, α -glucuronidase e β -manosidase, favorece a ocorrência de efeitos sinérgicos, aumentando a taxa de conversão e otimizando a liberação de AF (MAIBAM; GOYAL, 2025). No entanto, um dos principais entraves ao uso dessas formulações é o elevado custo das enzimas comerciais (MAIBAM; GOYAL, 2023). Considerando esse desafio, a presente pesquisa emprega uma β -mananase bruta, produzida por FES, na sacarificação da palha de milho, como alternativa de baixo custo e elevada eficiência para a valorização de resíduos lignocelulósicos.

A fim de demonstrar o desempenho da β -mananase, a Tabela 4 apresenta os resultados obtidos com a enzima utilizada isoladamente e em coquetéis enzimáticos, aplicados à sacarificação de diferentes biomassas lignocelulósicas.

Tabela 4- Rendimento de açúcares fermentescíveis obtido pela ação da β -mananase sobre diferentes biomassas lignocelulósicas.

Resíduo	Enzima	CS	AR	Referência
Casca de soja e bagaço de cana-de- açúcar	Mananase	40 °C /96 h; 40 °C 96 h	1,8 mg/mL 0,6 mg/mL	COSTA <i>et al.</i> , 2023; SAHU <i>et</i> <i>al.</i> , 2025
Palha de arroz (pré- tratada)	Mananase (70 U/mL)	37 °C/36 h	18,5 mg/mL	

Palha de arroz	Coquetel enzimático (lacase 10.859,51 UI/g, xilanase 22,01 UI/g; e mananase 10,36 UI/g	50 °C/144 h	95,34 mg/g	RASTOGI <i>et al.</i> , 2016
Torta de palmiste	Mananase (comercial)	pH: 4,5 45 °C/72 h	71,54 g/L	SHUKOR <i>et al.</i> , 2016
Madeira macia (pré-tratada)	Mananase	50 °C/ 48h	3,26 mg/mL	PHAM <i>et al.</i> , 2010
Bagaço de cana-de-açúcar	Coquetel enzimático contendo mananase	45 °C/ 16h	20 mg/mL	PRAJAPATI <i>et al.</i> , 2020

CS- Condições da sacarificação; AR- Açúcares redutores.

A eficiência da sacarificação é fortemente influenciada por parâmetros operacionais, como a carga de biomassa, a dosagem enzimática e o tempo de reação. A otimização cuidadosa dessas variáveis é essencial para maximizar a liberação de AF e assegurar a viabilidade técnico-econômica do processo em escala industrial (MAIBAM; GOYAL, 2025).

Dessa forma, os avanços no desenvolvimento e aplicação de preparações enzimáticas de baixo custo, representam um passo promissor para a viabilização de tecnologias mais sustentáveis e economicamente acessíveis na cadeia de produção de biocombustíveis.

3.5. Aspectos gerais de diversos resíduos agroindustriais/biomassa

3.5.1. Casca da amêndoa de cacau

O cacaueiro (*Theobroma cacao*), pertencente à família Sterculiaceae, é uma planta tropical de expressiva relevância socioeconômica. Seu cultivo concentra-se predominantemente em regiões tropicais, com destaque para a África Ocidental, incluindo Costa do Marfim, Gana, Nigéria e Camarões, além da Indonésia, Brasil e Papua-Nova Guiné (SALCEDO-PUERTO; MENDOZA-MARTINEZ; VAKKILAINEN, 2025). As principais variedades de cacau são tradicionalmente agrupadas em quatro categorias, o Crioulo, Trinitário, Forasteiro e Nacional, classificados com base na origem geográfica e nas características morfológicas dos grãos (SÁNCHEZ *et al.*, 2023).

A planta, que pode atingir entre 4 e 10 metros de altura, inicia a frutificação por volta dos três anos, alcançando sua produtividade máxima entre os oito e nove anos. Os frutos medem de 15 a 25 cm e contêm de 20 a 40 sementes envoltas por uma mucilagem branca. Essas sementes,

conhecidas como amêndoas de cacau, são a principal matéria-prima utilizada na produção de chocolate (MEZA-SEPÚLVEDA; HERNANDEZ-URREA; VALENCIA-SANCHEZ, 2025). A Figura 10 ilustra a morfologia do fruto do cacau, destacando suas principais partes.



Figura 10- Partes do fruto do cacau. **Fonte:** Adaptado de AFEDZI *et al.*, 2023.

De acordo com dados do IBGE (2023a), o valor da produção de cacau no Brasil tem apresentado crescimento nos últimos anos, alcançando R\$ 4.633.660 em 2023 (Figura 11). Nesse mesmo ano, o país registrou uma área colhida de 612.775 hectares, resultando em uma produção total de 296.145 toneladas. O estado da Bahia se destacou como o principal produtor nacional, com 139.011 toneladas, sendo o município de Ilhéus o maior responsável por essa produção dentro do estado.

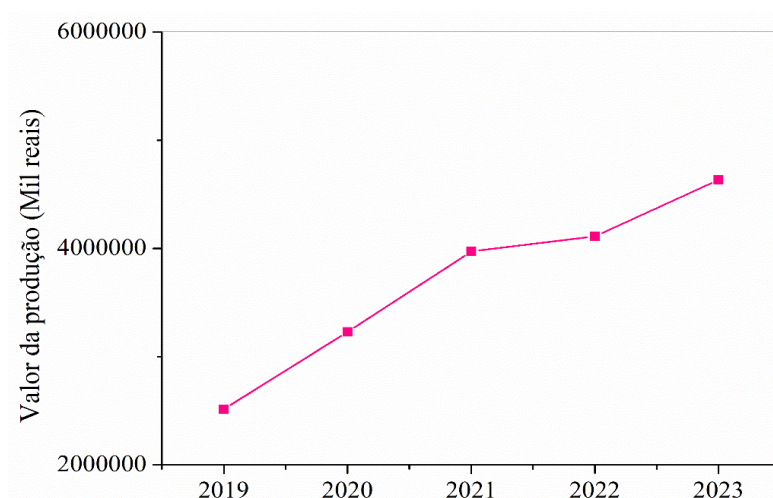


Figura 11- Valor da produção de cacau no Brasil de 2019-2023. **Fonte:** IBGE, 2023a.

Ao longo dos últimos 40 anos, a produção mundial de cacau tem apresentado crescimento contínuo, impulsionado por práticas sustentáveis que contribuem para o aumento da produtividade, melhoria da renda familiar, melhores condições de trabalho e preservação ambiental (PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE *et al.*, 2022). A principal matéria-prima de interesse comercial é a amêndoa, essencial para a fabricação de manteiga, cacau em pó, chocolate e outros derivados amplamente utilizados pela indústria alimentícia (PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE *et al.*, 2022; SOARES; OLIVEIRA, 2022). As exportações dos derivados já ultrapassam os US\$ 47 bilhões, sendo a Europa a responsável por aproximadamente 45% do consumo global, seguida pelos Estados Unidos (VÁSQUEZ *et al.*, 2019).

Embora a polpa do fruto apresente sabor agradável, é a amêndoa que detém maior valor agregado e relevância econômica (SOARES; OLIVEIRA, 2022). Em 2023, o mercado global de grãos de cacau movimentou cerca de US\$ 13,5 bilhões, com projeções indicando um crescimento que pode alcançar US\$ 23,5 bilhões até 2030 e expectativa de expansão a uma taxa composta de crescimento anual (CAGR) de 8,2% ao longo do período previsto (GRAND VIEW RESEARCH, 2025a).

Contudo, a cadeia produtiva do cacau é também responsável pela geração de expressivos volumes de resíduos agroindustriais. Com uma produção anual estimada em 4,7 milhões de toneladas de cacau (LEE *et al.*, 2025), calcula-se que apenas 10 a 20% do peso total do fruto seja aproveitado comercialmente, enquanto os 80 a 90% restantes correspondem a resíduos provenientes de diferentes partes do fruto, como a casca do fruto, a mucilagem e a casca da amêndoa (SALCEDO-PUERTO; MENDOZA-MARTINEZ; VAKKILAINEN, 2025).

Dentre os diversos resíduos gerados ao longo da cadeia produtiva do cacau, destaca-se a casca da amêndoa (Figura 12), que corresponde à camada externa que recobre o grão. Esse subproduto é removido durante a etapa de torrefação, representando cerca de 12 a 20% do peso total do grão (LEE *et al.*, 2025) e, em 2023, sua produção global foi estimada em aproximadamente 980 mil toneladas, com a Europa destacando-se como a principal região produtora (SALCEDO-PUERTO; MENDOZA-MARTINEZ; VAKKILAINEN, 2025).



Figura 12- Resíduo da casca da amêndoa do cacau seca e moída (2mm). **Fonte:** A autora.

Caracterizada como um resíduo lignocelulósico de elevado potencial tecnológico, a casca da amêndoa do cacau (CAC) apresenta alto teor de lignina (21,8%), celulose (27,15%), hemicelulose (6,6%), proteínas (17,85%), além de macro e microminerais (ALMEIDA LESSA *et al.*, 2023) e diversos compostos bioativos, como catequina, epicatequina, procianidina B2, quercetina e ácido protocatecuico (LIM *et al.*, 2025). Essa composição favorece seu aproveitamento em diferentes setores, como nas indústrias (química, alimentícia, ambiental) e também na área da saúde humana (SOARES; OLIVEIRA, 2022). A Tabela 5 reúne exemplos de produtos e/ou aplicações desenvolvidos a partir da CAC.

Tabela 5- Produtos/aplicações tecnológicas de derivados da casca da amêndoa de cacau reportadas na literatura.

Produto/Aplicação	Referência
Produção de compostos bioativos com propriedades de clareamento da pele	PATTANAKITJAROENCHAI; PITSAWONG; KHAT-UDOMKIRI, 2025
Formulação de ração para vacas leiteiras no início da lactação	REICHE <i>et al.</i> , 2025
Hidrochar	LIM <i>et al.</i> , 2025
Bebida funcional	SÁNCHEZ <i>et al.</i> , 2024
Nanopartículas de prata	SANTOS <i>et al.</i> , 2024, 2025
Ácidos graxos de cadeia curta	DISCA; CAPUANO; ARLORIO, 2024
Fertilizantes	ANDOH-MENSAH <i>et al.</i> , 2023
Filmes biodegradáveis	GRAVIER-RODRÍGUEZ <i>et al.</i> , 2023; SOUZA <i>et al.</i> , 2023
Oligossacarídeos	YOUNES; KARBOUNE, 2023
Misturas enzimáticas para melhorar o rendimento de óleo essencial de <i>Pimenta dioica</i>	TAVARES <i>et al.</i> , 2024
Adsorvente de corantes na indústria têxtil	DA SILVA SOUZA <i>et al.</i> , 2024
	MONTEIRO <i>et al.</i> , 2023

Inibidor da corrosão em aço carbono	
Enzimas (endoglucanase, xilanases e lipase)	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2018; REIS <i>et al.</i> , 2020; SALES DE MENEZES <i>et al.</i> , 2021
Bolo	SOUZA <i>et al.</i> , 2022

Dessa forma, o aproveitamento da casca da amêndoa de cacau configura-se como uma estratégia sustentável e eficaz para reduzir os impactos ambientais associados ao seu descarte inadequado, ao mesmo tempo em que contribui para o fortalecimento da bioeconomia e a valorização da cadeia produtiva do cacau.

Considerando esse cenário, a presente pesquisa elegeu a casca da amêndoa de cacau como uma das matérias-primas, dada sua ampla disponibilidade na região de Ilhéus (BA), um dos maiores polos brasileiros de produção de cacau. A abundância desse resíduo, associada à viabilidade logística e ao interesse regional por soluções sustentáveis, torna a CAC um insumo estratégico para o desenvolvimento de produtos inovadores, promovendo o aproveitamento de biomassa residual e o estímulo à economia local.

3.5.2. Casca de tamarindo

O tamarindeiro (*Tamarindus indica* L.) é uma árvore perene e dicotiledônea pertencente à subfamília Caesalpinioideae da família Fabaceae (Leguminosae) (MANSINGH *et al.*, 2021). Seus frutos, de coloração marrom e formato de vagem, são típicos de regiões tropicais e amplamente cultivados em diversas partes do mundo, com destaque para a África, Índia, Américas e Sudeste Asiático (INTIYA *et al.*, 2024). Suas vagens são longas e geralmente abrigam de 3 a 10 sementes envoltas por uma polpa comestível de coloração marrom (PAZ *et al.*, 2015). Cada vagem apresenta sementes compostas por duas estruturas principais: a testa, que corresponde à túnica externa, e o caroço, formado pelo endosperma (Figura 13).

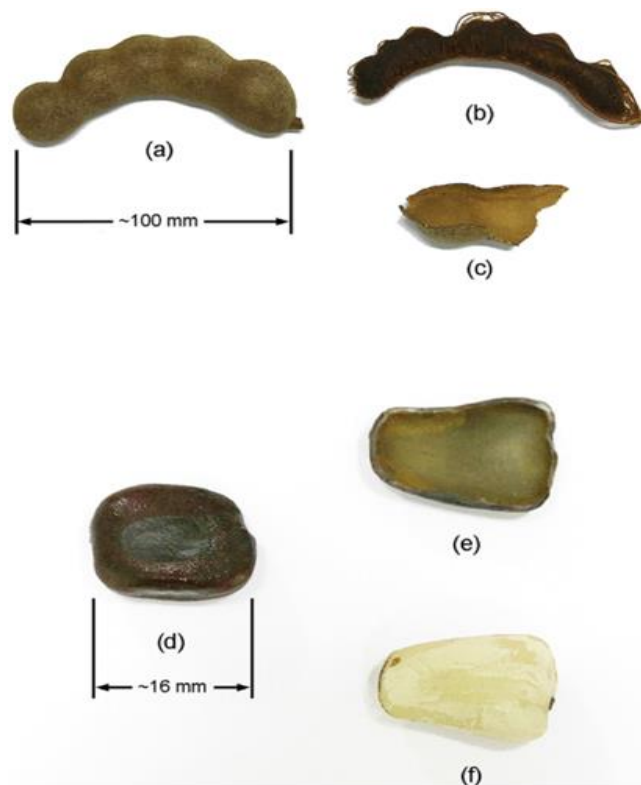


Figura 13- Vagem de tamarindo e suas composições; **(a)** vagem, **(b)** polpa, **(c)** casca, **(d)** semente, **(e)** testa e **(f)** caroço. **Fonte:** Adaptado de (NORAPHAIPHIPAKSA et al., 2016).

Quando plenamente maduras, as vagens apresentam uma polpa escura e succulenta, enquanto as cascas tornam-se secas e frágeis, facilitando sua remoção. Em média, uma vagem de tamarindo é composta por aproximadamente 55% de polpa, 34% de sementes e 11% de casca e fibras (INTIYA *et al.*, 2024). As sementes e cascas de tamarindo, subprodutos gerados durante o processamento da polpa, são comumente descartadas como resíduos, embora constituam uma matéria-prima de elevado valor (Figura 14). As pesquisas têm se dedicado à sua valorização, destacando a produção e aplicação de diversos compostos derivados como uma estratégia promissora para o uso integral do fruto (CHINTA *et al.*, 2025).



Figura 14- Resíduo da casca de tamarindo seca moída (2mm). **Fonte:** A autora.

Diversos experimentos já foram realizados com essa biomassa agrícola, apresentando resultados promissores quanto ao seu potencial de aplicação, conforme ilustrado na Tabela 6.

Tabela 6- Produtos/aplicações de derivados dos resíduos de tamarindo (*Tamarindus indica* L.).

Parte do fruto	Produto/Aplicação	Referência
Casca do fruto	Síntese de carbono	DHARMESH; RANI; SHARMA, 2025
	Produção de nanofolhas de carvão ativado	THIRUMAL <i>et al.</i> , 2021
	Gaseificador de biomassa	MURUGAN; JOSEPH SEKHAR, 2021
	Aditivo verde na produção de borracha natural	INTIYA <i>et al.</i> , 2024
	Catalisador para produção de biodiesel	NABORA; KINGONDU; KIVEVELE, 2019
	Produção de carbono com aplicação como adsorvente na remoção de flúor em águas subterrâneas	SIVASANKAR <i>et al.</i> , 2012
Casca da	Produção de pó modificado com nanopartículas de cobre com atividade antibacteriana	ASHOK <i>et al.</i> , 2020
	Extração de compostos antioxidantes	LUENGTHANAPHOL <i>et al.</i> , 2004

semente		
	Adsorvente para remoção de corantes em águas residuais de tinturaria de curtume	HASHEM <i>et al.</i> , 2025
	Produção de polissacarídeos para aplicação no tratamento de efluentes de café	C <i>et al.</i> , 2024
	Produção de celulose microcristalina	DIVAKARAN <i>et al.</i> , 2024
Semente	Produção de biochar nanomagnético para remoção de azul de metila e verde malaquita da água	BAYRAM <i>et al.</i> , 2023
	Produção de polissacarídeos para remoção de poluentes de águas residuais da produção de queijos	SOFIAVIZHIMALAR <i>et al.</i> , 2022

O reaproveitamento da casca de tamarindo permite sua transformação em um material de valor agregado, com potencial para aplicações tecnológicas diversas, contribuindo de forma eficaz para a mitigação de problemas relacionados ao manejo de resíduos e promovendo a sustentabilidade por meio da redução de impactos ambientais.

Apesar do crescente número de investigações voltadas à valorização da casca de tamarindo, até onde se tem conhecimento, não há registros na literatura científica que relatem sua aplicação na produção de enzimas, especialmente por meio da fermentação em estado sólido. Nesse contexto, o presente estudo representa uma abordagem inédita ao propor o uso da casca de tamarindo como substrato para a produção enzimática, contribuindo de forma original para a ampliação das possibilidades de aproveitamento desse subproduto agroindustrial.

3.5.3. Ora-pró-nóbis

As plantas alimentícias não convencionais (PANCs) ainda são pouco incorporadas na dieta cotidiana, apesar de apresentarem elevado valor nutricional (MACIEL *et al.*, 2021). Muitas dessas espécies possuem uma ou mais partes comestíveis, com alto potencial de aproveitamento. Entre elas, destaca-se a *Pereskia aculeata* Mill., popularmente conhecida como ora-pro-nóbis (OPN) (HOFF *et al.*, 2022).

A OPN pertence ao gênero *Pereskia*, o único da família Cactaceae que possui folhas verdes. Esse gênero inclui cerca de 17 espécies, entre as quais *Pereskia grandifolia*, *Pereskia aculeata* e *Pereskia bleo* são as mais conhecidas, diferenciando-se principalmente pelo tamanho das folhas,

presença de espinhos e coloração das flores (TORRES *et al.*, 2022b). Trata-se de um cacto trepador, de caules espinhosos e folhas grandes, podendo atingir até 10 metros de comprimento (SANTOS *et al.*, 2024a).

No Brasil, a OPN distribui-se desde o Nordeste até o Sul, preferindo bordas de mata e clareiras florestais (CONCEIÇÃO *et al.*, 2014). Por sua rusticidade, adapta-se a solos pobres e é facilmente propagada, sendo considerada planta invasora em algumas regiões. No entanto, no contexto brasileiro, é cultivada em hortas domésticas, geralmente sem o uso de insumos químicos, com fins alimentares (PUMA VEGA *et al.*, 2020).

A Figura 15 ilustra o aspecto visual do pó obtido a partir das folhas secas de ora-pro-nóbis, uma das formas mais comuns de aproveitamento da planta em formulações alimentares e nutraceuticas.



Figura 15- Pó de ora-pro-nóbis obtido após secagem e trituração das folhas. **Fonte:** A autora.

As folhas apresentam superfície lisa, cor verde-escura, textura succulenta e formato variável entre elíptico e simétrico, podendo atingir 15 cm de comprimento e 8 cm de largura. Seu notável potencial adaptativo permite um bom crescimento vegetativo mesmo em condições adversas, o que reforça sua viabilidade para cultivo em diferentes regiões do mundo (SANTOS *et al.*, 2024a).

Tradicionalmente, suas folhas são utilizadas em preparações culinárias doces e salgadas, especialmente entre as populações do Sul ao Nordeste do Brasil. Em comunidades de baixa renda, é reconhecida como a “carne dos pobres”, por ser uma das principais fontes proteicas acessíveis (GARCIA *et al.*, 2019).

Do ponto de vista nutricional, a OPN se destaca por apresentar cerca de 25% de proteína, superando alimentos tradicionais como repolho (1,6%), alface (1,3%), milho (7,6–10%) e feijão (18–20%) (SILVA *et al.*, 2017). Aproximadamente 60% dessa proteína, com pesos moleculares entre 15 e 61 kDa, é composta por aminoácidos essenciais, como triptofano, leucina, lisina, fenilalanina e tirosina (MILIÃO *et al.*, 2022). A lisina, em particular, representa de 5 a 6% do

conteúdo proteico, sendo estratégica para enriquecer dietas à base de cereais, frequentemente pobres nesse aminoácido. Embora associada a fontes animais, a lisina está presente em quantidades relevantes na OPN, cujos perfis de aminoácidos essenciais e não essenciais atendem ou superam as recomendações da FAO, com destaque para o triptofano, um dos mais abundantes (MARTIN *et al.*, 2017).

Em termos de micronutrientes, o conteúdo de ferro e cálcio da ora-pro-nóbis é superior ao de vegetais como brócolis, espinafre e acelga (MACIEL *et al.*, 2021). Estudos também revelam teores expressivos de fibras (37,23%), cinzas (11,90%), carboidratos (51,61%), ferro (47,81 mg/g) e compostos fenólicos (151,60 mg GAE g⁻¹) (MACIEL *et al.*, 2021), além de vitaminas A, C e E em quantidades significativas (TIAN *et al.*, 2025).

As folhas concentram proteínas associadas a cadeias de arabinogalactana, compostas por galactose, arabinose, ramnose e ácido galacturônico. A planta também é produtora de uma mucilagem não tóxica, biocompatível e de baixo custo de extração, o que favorece sua aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica (DE MORAIS *et al.*, 2025). Esta mucilagem, rica em carboidratos com alta capacidade de retenção de água, apresenta propriedades emolientes relevantes (BORGES-MACHADO *et al.*, 2024). Adicionalmente, são relatadas atividades antioxidante, anti-inflamatória, anti-hemolítica, antiulcerosa e neuroprotetora (SILVA *et al.*, 2024). Vale ressaltar que a composição química das folhas pode variar de acordo com as condições do solo, o que afeta diretamente o teor de nutrientes na mesma espécie (DA CRUZ *et al.*, 2024a).

O crescente interesse científico pela OPN também se deve à sua notável tolerância ao estresse hídrico e ao seu amplo leque de potenciais aplicações (PUMA VEGA *et al.*, 2020). Sua versatilidade tecnológica tem impulsionado o desenvolvimento de diversas aplicações práticas, já relatadas na literatura científica e sintetizadas na Tabela 7, que ilustram seu potencial em contextos alimentares, farmacêuticos e ambientais.

Tabela 7- Produtos/aplicações da ora-pró-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.).

Produto/aplicação	Referência
Extração de compostos com potencial neuroprotetor	TORRES <i>et al.</i> , 2022a
Emprego da mucilagem como um novo ingrediente em tinta alimentícia para impressão 3D.	SVIECH <i>et al.</i> , 2024
Desenvolvimento de membranas de	MENDES <i>et al.</i> , 2024

nanofibras com propriedades curativas	
Inclusão da farinha na produção de uma bebida	VIEIRA <i>et al.</i> , 2020
Aplicação do extrato foliar na produção de micropartículas coloidais enriquecidas com ferro	MACIEL <i>et al.</i> , 2020
Uso da mucilagem na encapsulação α -tocoferol	NEVES <i>et al.</i> , 2020
Emprego da mucilagem na produção de queijo Petit Suisse	SILVA <i>et al.</i> , 2021
Encapsulamento de probióticos (<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC4356)	DE MORAIS <i>et al.</i> , 2025
Uso do extrato na produção filmes de desintegração oral	DE MORAIS <i>et al.</i> , 2025
Aplicação da mucilagem como emulsificante natural	LAGO <i>et al.</i> , 2019
Produção de hidrocolóides funcionais	CONCEIÇÃO <i>et al.</i> , 2014
Formulação de bebida láctea fermentada	AMARAL <i>et al.</i> , 2018
Produção de L-asparaginase via fermentação em estado sólido	LIMA PARENTE FERNANDES <i>et al.</i> , 2021
Elaboração de biscoitos com foco na saúde intestinal	VIEIRA <i>et al.</i> , 2019
Desenvolvimento de pão isento de glúten e lactose	SILVA <i>et al.</i> , 2025
Utilização da mucilagem como substituto da pectina comercial na produção de geleia de jabuticaba	BATISTA <i>et al.</i> , 2025
Extração de enzimas proteolíticas (proteases)	ALVES <i>et al.</i> , 2022
Uso da mucilagem como agente crioprotetor em morangos	PIVA <i>et al.</i> , 2025
Inserção da farinha na dieta de tilápias	MATOS <i>et al.</i> , 2025

para promover o crescimento e a absorção intestinal	
Produção de hidrogéis a partir da mucilagem	MORAIS <i>et al.</i> , 2023
Utilização da farinha na formulação de bolos	TRENTIN; BAMPI; DINON, 2025
Obtenção de concentrado proteico	SANTOS <i>et al.</i> , 2024a
Produção de barra de cereais	DA CRUZ <i>et al.</i> , 2024a

Desta forma, a OPN apresenta também potencial para ser utilizada em processos de bioconversão, como a produção de enzimas por fermentação em estado sólido, um campo que tem ganhado destaque na busca por alternativas sustentáveis e eficientes para a biotecnologia moderna.

3.5.4. Palha de milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta anual pertencente à família Poaceae e à ordem Cyperales, geralmente atingindo cerca de 2,5 metros de altura e apresentando frutos granulosos, de coloração amarela ou branca. Dentre as quatro espécies do gênero *Zea*, *Z. mays* se destaca por sua importância econômica, possuindo diversos híbridos comerciais que variam quanto à composição química e à morfologia dos grãos (AHMED *et al.*, 2023; VELJKOVIĆ *et al.*, 2018). Trata-se de uma monocotiledônea herbácea de origem mesoamericana, atualmente cultivada em larga escala em regiões tropicais e temperadas ao redor do mundo (ZHANG *et al.*, 2021).

O milho é amplamente utilizado como ração animal, matéria-prima industrial e, em menor escala, como alimento humano, especialmente em países em desenvolvimento. Na alimentação humana, é empregado na forma de grãos, farelo, amido e xaropes, enquanto seus diferentes componentes, como talos, grãos e sabugos, encontram aplicações na indústria farmacêutica e na produção de biocombustíveis (VELJKOVIĆ *et al.*, 2018).

Em 2023, a cultura do milho ocupou uma área colhida de aproximadamente 1,24 bilhões de hectares, resultando em uma produção global estimada em 208,23 milhões de toneladas. Trata-se da segunda commodity agrícola mais produzida no mundo, superada apenas pela cana-de-açúcar, cuja produção alcançou cerca de 2,03 bilhões de toneladas no mesmo período. As Américas lideraram a produção de milho com 623,23 milhões de toneladas, seguidas pela Ásia (403,73 milhões) e Europa (119,02 milhões) (Figura 16) (FAO, 2023).

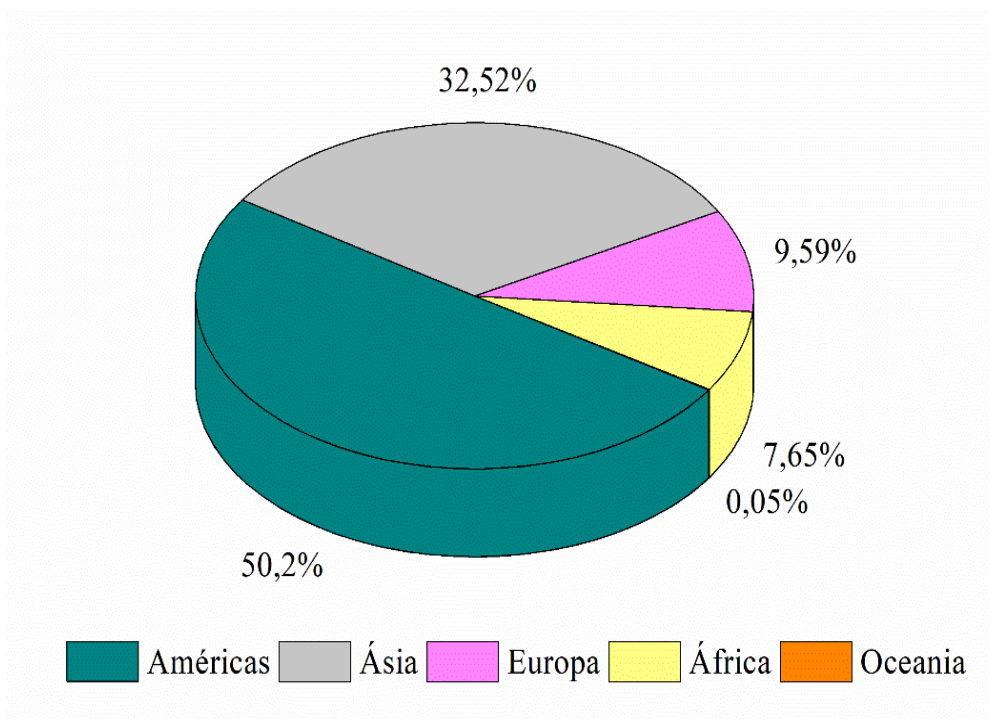


Figura 16- Principais regiões produtoras de milho no mundo em 2023. **Fonte:** FAO, 2023.

No ranking mundial, os Estados Unidos lideram com 389,69 milhões de toneladas, seguidos pela China (288,84 milhões) e pelo Brasil (131,95 milhões) (Figura 17) (FAO, 2023). O Mato Grosso destaca-se como o maior produtor a nível nacional, com uma produção de 13.443.031 toneladas (IBGE, 2023b).

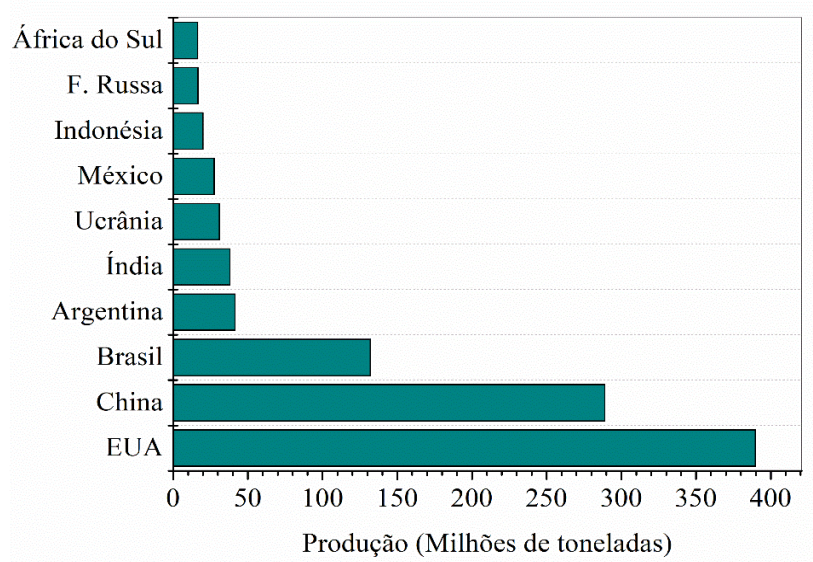


Figura 17- Dez maiores produtores de milho em 2023. **Fonte:** FAO, 2023.

A indústria global de milho e seus derivados, especialmente do amido, projeta atingir uma receita de aproximadamente US\$ 118,0 bilhões até 2030, impulsionada por uma taxa de crescimento anual

composta (CAGR) de 5,4% entre 2023 e 2030. Em 2022, o Brasil respondeu por 3,1% da receita global desse setor. No contexto latino-americano, o país desponta como o principal mercado emergente, com expectativa de liderar a receita regional até 2030, quando deverá alcançar um valor estimado em US\$ 3,32 bilhões (GRAND REVIEW RESEARCH, 2025b).

A alta produção global de milho também resulta na geração expressiva de resíduos agroindustriais. Os resíduos da cultura representam entre 20% e 30% da colheita e, frequentemente, são considerados subprodutos de baixo valor agregado (BOGGIONE *et al.*, 2020). Aproximadamente metade da biomassa da planta corresponde à palha de milho (Figura 18), resultando numa proporção de 1:1 entre massa de grão e resíduo. A palha é composta por cascas (8%), espigas (15%), folhas (28%) e talos (48%), partes que permanecem no campo após a colheita (AGHAEI *et al.*, 2022).



Figura 18- Resíduo da palha de milho seca e moída (2mm). **Fonte:** A autora.

Esses resíduos constituem materiais lignocelulósicos cuja composição pode variar em função da região e da estação do cultivo (AHMED *et al.*, 2023). Em termos químicos, a palha de milho contém celulose (42,1%), hemicelulose (21,9%), lignina (26,9%) e cinzas (2,6%) (LU *et al.*, 2024). Também apresenta frações significativas de glucanos (33,4%–41,3%), xilanos (13,9%–28,2%), carboidratos solúveis (glicose, frutose e sacarose) e proteínas (2,2%–9,3%) (PRADO; RIAL, 2025). Esses dados evidenciam o grande potencial da palha de milho como matéria-prima para aplicações industriais diversas, conforme indicado na Tabela 8.

Tabela 8- Produtos/aplicações da palha de milho.

Produto/aplicação	Referências
Ácido acético	CHEN <i>et al.</i> , 2025
Biohidrogênio	CHEN <i>et al.</i> , 2025b
Fibrocimento (para produção de tijolos)	HOUANKPO <i>et al.</i> , 2025

Biochar	GUO <i>et al.</i> , 2025
Nanocristais de celulose	LI <i>et al.</i> , 2025
Fertilizantes	KASIFAH; BILAD; BAJA, 2025
Bio-óleo	CHEN <i>et al.</i> , 2025b
Biogás	CHEN <i>et al.</i> , 2025b
Caproato	ZHANG <i>et al.</i> , 2024
Biocarvão	CHEN <i>et al.</i> , 2025d
Ácido succínico	WU <i>et al.</i> , 2024
Produção de proteína (para ração animal)	WANG <i>et al.</i> , 2025b
Biochar (para fotodegradação de corantes em águas residuais)	JIANG <i>et al.</i> , 2024
Filmes para embalagens (a partir da celulose extraída)	ZHANG <i>et al.</i> , 2024b
Ácidos graxos de cadeia curta	LIANG <i>et al.</i> , 2024
Xilooligossacarídeos, lignina e etanol	LIAO <i>et al.</i> , 2024
Filmes biodegradáveis antimicrobianos	LU <i>et al.</i> , 2024
Bioetanol	LIU <i>et al.</i> , 2023
Ácido acético	SHAN <i>et al.</i> , 2025
Produção de endoglucanase (via fermentação em estado sólido)	BOGGIONE <i>et al.</i> , 2020
Produção de metano	XU <i>et al.</i> , 2023a

Além disso, o milho é uma das principais fontes para a produção de etanol de primeira geração, ao lado da cana-de-açúcar (AGHAEI *et al.*, 2022). O segmento global de etanol de milho gerou uma receita de US\$ 7,29 bilhões em 2022, com previsão de atingir US\$ 11,51 bilhões até 2030, impulsionado por uma CAGR de 6% a partir de 2023 (GRAND REVIEW RESEARCH, 2025c). Diante disso, a composição lignocelulósica da palha de milho a torna especialmente adequada para processos de conversão energética, uma vez que a quebra dos polissacarídeos estruturais libera AF, substratos viáveis para a produção de biocombustíveis de segunda geração (YU *et al.*, 2024).

4. Glúten e doença celíaca

O glúten corresponde ao complexo proteico de reserva presente em cereais como trigo, cevada e centeio, sendo constituído principalmente por proteínas do grupo das prolaminas, denominadas gliadinas no trigo, hordeínas na cevada e secalinas no centeio (SPECTOR COHEN; DAY; SHAOUL, 2020). Entre suas principais frações estruturais, as gluteninas organizam-se em estruturas poliméricas estabilizadas predominantemente por ligações dissulfeto intermoleculares (SS), desempenhando papel essencial na coesão e elasticidade da massa. Por outro lado, as gliadinas apresentam majoritariamente ligações dissulfeto intramoleculares, além de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (Figura 19), resultando em estruturas mais compactas que contribuem para a viscosidade e extensibilidade da massa (MAGALHÃES *et al.*, 2025).

A interação entre essas duas frações resulta na formação de uma rede tridimensional viscoelástica capaz de reter os gases formados durante a fermentação e sustentar a expansão da massa no forneamento, sendo determinante para a estrutura, o volume e textura dos produtos panificados (SHEWRY; BELTON, 2024).

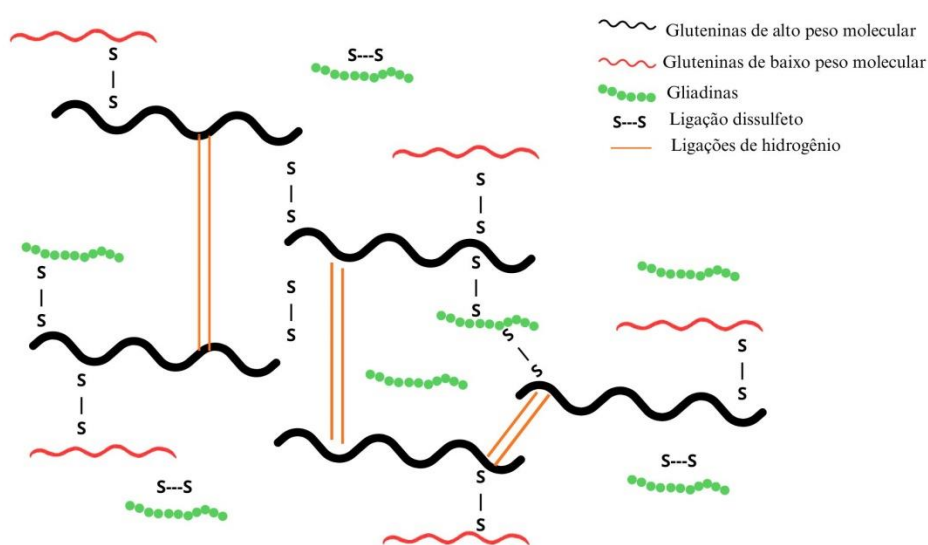


Figura 19- Estrutura do glúten. **Fonte:** Adaptado de MAGALHÃES *et al.*, (2025).

Entretanto, essa mesma organização estrutural também está relacionada ao potencial alergênico do glúten. A elevada estabilidade da rede proteica dificulta sua completa degradação no trato gastrointestinal, favorecendo a formação de fragmentos peptídicos capazes de desencadear respostas imunológicas em indivíduos suscetíveis (LIU *et al.*, 2026a).

Os distúrbios associados ao consumo de glúten são geralmente classificados em três principais categorias: doença celíaca (DC), alergia ao trigo e sensibilidade ao glúten não celíaca. Entre essas condições, a DC destaca-se como uma enfermidade autoimune fortemente associada

à predisposição genética, que afeta aproximadamente 1% da população mundial e apresenta tendência crescente de diagnóstico. A DC é caracterizada por inflamação crônica da mucosa intestinal, acompanhada da atrofia das vilosidades do intestino delgado, que compromete a absorção adequada de nutrientes (Figura 20) (DELIKANLI-KIYAK; OZCAN, 2026).

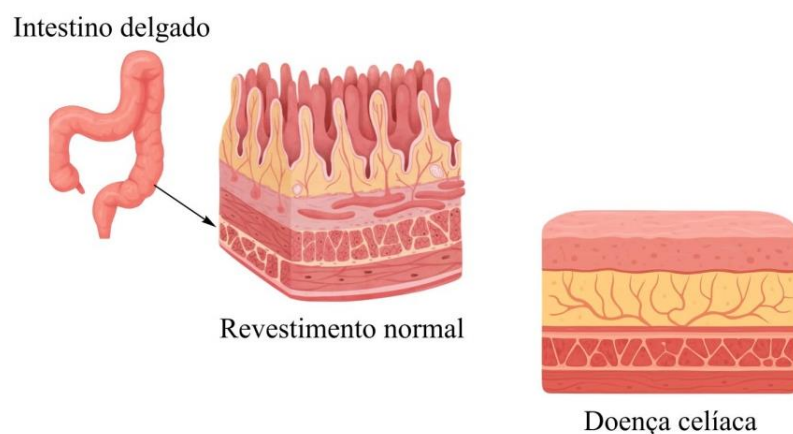


Figura 20- Danos estruturais das vilosidades do intestino delgado causados pela doença celíaca.

Fonte: Adaptado de DELIKANLI-KIYAK; OZCAN, (2026).

As manifestações clínicas da DC incluem principalmente, diarreia, perda de peso, fadiga, dor abdominal e articular, cefaleia e dermatite herpetiforme (DOYLE *et al.*, 2025). Quando não tratada, a DC pode levar a complicações a longo prazo, incluindo maior risco de neoplasias e maior predisposição ao desenvolvimento de outras doenças autoimunes (KOH *et al.*, 2019).

Atualmente, a única estratégia terapêutica eficaz para indivíduos com DC consiste na adoção rigorosa e permanente de uma dieta isenta de glúten. Para garantir a segurança desses consumidores, os alimentos rotulados como sem glúten devem atender aos critérios estabelecidos pelo Codex Alimentarius, que define que o termo “alimento sem glúten” só pode ser utilizado quando o teor de glúten no produto é inferior a 20 mg kg⁻¹. No entanto, esse limite pode variar de acordo com as regulamentações adotadas em diferentes países (MA *et al.*, 2026).

5. Mercado de produtos sem glúten

O crescimento do mercado de produtos sem glúten tem sido impulsionado não apenas pela necessidade dietética de indivíduos com DC, mas também pelo interesse crescente de consumidores que associam esses alimentos a padrões alimentares considerados mais saudáveis (MENSAH *et al.*, 2026).

Projeções indicam que mercado global de produtos sem glúten (PSG) poderá alcançar cerca de US\$ 18,32 bilhões até 2033, o que representa uma taxa composta de crescimento anual (CAGR) de 10,1% entre 2026 e 2033. Dentro desse mercado, o segmento de panificação se destaca como o mais representativo, correspondendo a cerca de 31,19% da participação total em 2025 (<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/gluten-free-products-market>).

Entre os principais PSG disponíveis comercialmente destacam-se os biscoitos (DOGRUER *et al.*, 2023), bolos (MADADI *et al.*, 2024), macarrão (ZIENA; ZIENA, 2026) e pães (DE AGUIAR *et al.*, 2024). Nesse contexto, o pão sem glúten figura como um dos produtos de maior relevância no segmento de panificação, com projeções indicando que esse mercado poderá atingir aproximadamente US\$ 1,09 bilhão até 2030 (GRAND VIEW RESEARCH, 2026).

5.1. Pão sem glúten

O pão está entre os alimentos mais antigos produzidos pela humanidade e permanece como um dos produtos mais consumidos em todo o mundo, presente na alimentação de diferentes culturas e classes sociais. Sua ampla aceitação está associada à praticidade de consumo, ao custo relativamente baixo e à grande diversidade de formulações disponíveis, que resultam em produtos com variados sabores, texturas e perfis nutricionais (SADEGHI *et al.*, 2025).

No Brasil, a definição regulatória de pão é estabelecida pela Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005, segundo a qual esses produtos são obtidos a partir de farinha de trigo e/ou outras farinhas, adicionadas de líquido e submetidas ou não a processos de fermentação, seguidos de cocção. A regulamentação também permite a incorporação de outros ingredientes, desde que não descaracterizem o produto, podendo ainda apresentar diferentes formatos, texturas, coberturas ou recheios (BRASIL, 2005).

De modo geral, os ingredientes básicos empregados na panificação incluem farinha, água, fermento biológico e sal, que constituem a base estrutural das formulações. Além da composição, as etapas tecnológicas como mistura da massa, fermentação e cozimento exercem influência direta sobre as propriedades físicas e sensoriais do produto final (WANG; TONG; SCANNELL, 2026).

Tradicionalmente, o pão é produzido a partir da farinha de trigo, matéria-prima que apresenta propriedades tecnológicas adequadas para a panificação devido à presença das proteínas formadoras do glúten. Durante a hidratação e mistura da massa, essas proteínas interagem formando uma rede viscoelástica capaz de reter os gases produzidos na fermentação, favorecendo o desenvolvimento do volume e da estrutura característica do pão (MESTA-CORRAL *et al.*, 2024).

Entretanto, para indivíduos com DC, a presença dessa proteína representa uma limitação significativa, tornando necessária a exclusão completa do glúten da dieta. Nesse contexto, o

desenvolvimento de produtos panificados sem glúten tem recebido crescente atenção tanto da comunidade científica quanto da indústria de alimentos.

Todavia, a ausência dessa proteína compromete significativamente o comportamento reológico da massa, uma vez que o glúten desempenha papel central na formação da rede estrutural responsável pela estabilidade do sistema. Como consequência, pães elaborados com matérias-primas naturalmente isentas de glúten frequentemente apresentam limitações tecnológicas, incluindo baixa elasticidade da massa, menor retenção de gases durante a fermentação e redução do volume específico e vida útil. Além disso, esses produtos podem apresentar textura mais firme e características sensoriais menos atrativas quando comparados aos pães tradicionais à base de trigo (DJEUKEU *et al.*, 2024; MA *et al.*, 2026)).

Diante dessas limitações, observa-se uma crescente demanda por pães sem glúten que apresentem características cada vez mais próximas às dos pães convencionais. Nesse sentido, o pão elaborado com farinha de trigo continua sendo considerado o principal padrão de referência para a avaliação da qualidade tecnológica e sensorial desses produtos (WANG; JIAN, 2022).

Com o objetivo de minimizar tais limitações, diferentes matérias-primas têm sido investigadas como alternativas à farinha de trigo na produção de pães sem glúten. Diversos estudos têm explorado o uso de farinhas obtidas de diferentes fontes vegetais, visando melhorar simultaneamente o valor nutricional e as propriedades tecnológicas desses produtos. Essas matérias-primas apresentam composições químicas distintas, o que influencia diretamente o comportamento reológico da massa e as características finais do produto (BANU; APRODU, 2022).

A Tabela 9 apresenta exemplos de diferentes farinhas utilizadas na formulação de pães sem glúten descritas na literatura recente.

Tabela 9- Pães sem glúten produzidos a partir de diferentes matérias-primas.

Farinhas	Referência
Arroz + tapioca	(ABOU-ELSOUD <i>et al.</i> , 2026)
Lentilha e amaranto	(PISTORIO <i>et al.</i> , 2026)
Arroz	(LIU <i>et al.</i> , 2026b)
Sorgo e arroz	(DE AGUIAR <i>et al.</i> , 2026)
Grão-de-bico	(JIANG <i>et al.</i> , 2026)
Milho e arroz	(PÉREZ-RODRÍGUEZ <i>et al.</i> , 2025)
Banana verde, batata-doce e mandioca	(CARLIER <i>et al.</i> , 2025)
Quinoa	(HE <i>et al.</i> , 2025)

Bagaço de maçã e linhaça	(CANTERO-RUIZ DE EGUINO <i>et al.</i> , 2025)
Semente de abóbora	(BURBANO <i>et al.</i> , 2025)
Resíduos de alcachofra	(PROETTO <i>et al.</i> , 2024)
Milheto	(DE AGUIAR <i>et al.</i> , 2024)
Banana verde	(GUADALUPE-MOYANO <i>et al.</i> , 2022)

Entretanto, apesar da ampla diversidade de matérias-primas disponíveis, a simples substituição da farinha de trigo por farinhas naturalmente isentas de glúten geralmente não é suficiente para reproduzir as propriedades estruturais observadas no pão convencional. Assim, o desenvolvimento de pães sem glúten com qualidade tecnológica satisfatória frequentemente requer a adoção de estratégias tecnológicas complementares, baseadas na incorporação de aditivos tecnológicos que atuem de forma similar ao glúten em formulações tradicionais (DJEUKEU *et al.*, 2024).

6. Estratégias tecnológicas aplicadas à pães sem glúten

O aprimoramento das formulações por meio da incorporação de aditivos tecnológicos tem sido amplamente explorado como estratégia para superar os desafios associados à produção de pães sem glúten. Conforme mostra a Tabela 10, diferentes classes de aditivos, como hidrocolóides, proteínas, fibras, amido, compostos bioativos e enzimas contribuem significativamente para a melhoria das propriedades tecnológicas desses produtos, favorecendo características como textura, volume e aceitação sensorial.

Esses componentes podem ser utilizados de forma isolada ou em combinação, sendo que cada classe exerce funções específicas na massa, enquanto o uso combinado pode promover efeitos complementares capazes de minimizar uma ou mais limitações estruturais presentes nas formulações isentas de glúten (DJEUKEU *et al.*, 2024).

Tabela 10- Diferentes classes de aditivos utilizados para melhorar a qualidade de produtos sem glúten.

Grupo de aditivos	Aditivo	Referência
	Transglutaminase	(SUTRISNO <i>et al.</i> , 2025)
	Amilase	(SADEGHIAN MOTAHAR <i>et al.</i> , 2021)
	Lacase	(AYALA-SOTO; SERNA-SALDÍVAR; WELTI-CHANES, 2017)

Enzimas	Glicoseoxidase, xilanase e protease	(SARABHAI; TAMILSELVAN; PRABHASANKAR, 2021)
	Lipase e protease	(AZIZI <i>et al.</i> , 2020)
Hidrocolóides	Hidroxipropilmetil celulose	(HERNÁNDEZ-AGUIRRE <i>et al.</i> , 2019)
	Goma xantana	(MENSAH <i>et al.</i> , 2026; ZHANG <i>et al.</i> , 2025)5/25/2026 10:41:00 PM
	Goma guar	(HAMDANI <i>et al.</i> , 2024)
	Goma de alfarroba	(LIU <i>et al.</i> , 2026b)
	Pectina	(MA <i>et al.</i> , 2026)
Fibras/fonte de fibras	Fibras isoladas de vegetais	(RÓŽAŇSKA <i>et al.</i> , 2025)
	Casca de fava	(CHOCKCHAI SAWASDEE <i>et al.</i> , 2023)
	Psílio	(FRATELLI <i>et al.</i> , 2021)
	Amido resistente	(PILUK <i>et al.</i> , 2025)
Proteínas/fonte de proteínas	Proteínas do grão-de-bico, milho e ervilha	(FAN <i>et al.</i> , 2026)
	Farinha de inseto fermentada	(PÉREZ-RODRÍGUEZ <i>et al.</i> , 2025)
	Microalgas (Espirulina e <i>Chorella</i>)	(FREITAS <i>et al.</i> , 2024; PEÑALVER; NIETO, 2024)
	Zeína	(ZHANG <i>et al.</i> , 2022)
	Soro do leite	(WAZIIROH <i>et al.</i> , 2023)
Amido	Amido de milho, batata e tapioca; tubérculos e cereais	(BOUREKOUA <i>et al.</i> , 2025; WAZIIROH <i>et al.</i> , 2021)
Compostos bioativos	Polifenóis	(MONTES <i>et al.</i> , 2024)
Outros	Oleogéis e lipoproteína	(ABOU-ELSOUD <i>et al.</i> , 2026)
	Nanocelulose	(CHEN <i>et al.</i> , 2026)

6.1. Hidrocolóides

Os hidrocolóides são polímeros hidrofílicos de alto peso molecular e cadeia longa que desempenham um papel fundamental na indústria de alimentos devido à sua versatilidade. Estruturalmente, esses compostos possuem diversos grupos funcionais, como hidroxila, carboxila e amino, que conferem uma elevada afinidade por moléculas de água (ZHANG *et al.*, 2023). Essa característica permite que os hidrocolóides apresentem alta capacidade de hidratação, possibilitando sua dispersão ou solubilização em meios aquosos para a formação de sistemas coloidais estáveis, géis e soluções com propriedades específicas de espessamento e emulsificação (IRONDI *et al.*, 2023).

A origem desses polímeros é diversa, podendo ser extraídos de fontes naturais, como plantas, animais, algas e microrganismos, ou produzidos de forma semissintética. Entre os semissintéticos, destacam-se os derivados de celulose, que passam por modificações químicas para otimizar suas funcionalidades tecnológicas (SHENG *et al.*, 2025). Devido ao seu caráter atóxico e à ampla gama de propriedades tecnofuncionais, os hidrocolóides são essenciais para estabilizar e conferir textura a diversos produtos alimentícios.

Na panificação voltada para indivíduos com DC, os hidrocolóides são frequentemente utilizados como substitutos estruturais do glúten. Em massas que carecem da rede proteica tradicional, esses aditivos interagem com o amido, proteínas e outros componentes da matriz por meio de ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e forças de van der Waals. Esse complexo de interações resulta na criação de uma rede tridimensional estável, que mimetiza as funções do glúten ao modificar o comportamento reológico da massa (SHENG *et al.*, 2025).

Tecnologicamente, a incorporação de hidrocolóides aumenta a consistência da massa e reduz sua fluidez, o que é crucial para melhorar o manuseio e, principalmente, a retenção de gases durante as fases de mistura e fermentação (GONZÁLEZ; ÁLVAREZ BARRETO; TOLABA, 2025).

Entre os hidrocolóides mais utilizados na formulação de produtos sem glúten, destaca-se a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).

6.2. Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)

A HPMC é um polímero hidrofílico semissintético pertencente à classe dos éteres de celulose. Sua síntese ocorre a partir da metilcelulose por meio da reação com propileno e óxido alcalino, resultando em uma molécula onde os grupos hidroxila originais da celulose são substituídos por grupos metoxi e hidroxipropil (Figura 21). Essa modificação estrutural confere ao

polímero solubilidade em água e em diversos solventes orgânicos, permitindo sua ampla utilização como agente espessante, estabilizante e emulsificante em diversos setores industriais (PIRSA; HAFEZI, 2023).

Visualmente, a HPMC apresenta-se como um pó branco higroscópico de fácil escoamento. Devido à ausência de sabor e odor, além de ser um composto atóxico e biocompatível, sua utilização como aditivo alimentar é aprovada por rigorosas agências reguladoras, como a FDA (Food and Drug Administration) e a União Europeia (VLAD *et al.*, 2025).

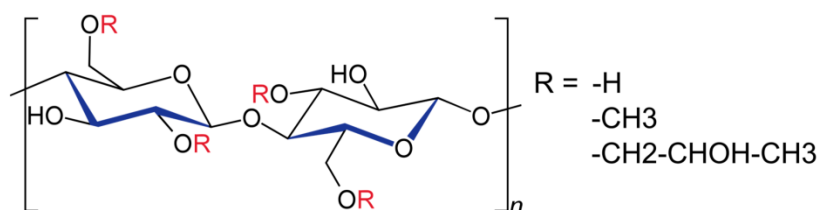


Figura 21- Estrutura da hidroxipropilmetilcelulose. **Fonte:** (VLAD *et al.*, 2025).

A HPMC destaca-se pelo seu comportamento termorreversível. Em baixas temperaturas, o polímero apresenta alta capacidade de retenção de água e hidratação. Sob aquecimento, ocorre a gelificação térmica, onde interações hidrofóbicas entre as cadeias formam uma rede de gel robusta com liberação simultânea de água. A temperatura exata desse processo e a solubilidade do polímero são reguladas pelas proporções de substituição dos grupos metil e hidroxipropil em sua estrutura (HAGER; ARENDT, 2013).

Na produção de pães sem glúten, a HPMC tem se consolidado como um aditivo altamente eficaz para mitigar as deficiências estruturais causadas pela ausência da rede proteica tradicional. Estudos indicam que este aditivo é capaz de proporcionar maior maciez e uma estrutura de miolo mais uniforme, além de reduzir a dureza e a perda de peso durante o forneamento. Como resultado final, obtêm-se pães com maior volume específico e características sensoriais significativamente aprimoradas, aproximando-os do padrão de qualidade dos pães de trigo convencionais (VILLANUEVA *et al.*, 2024; ZHAO *et al.*, 2021).

6.3. Enzimas

O uso de enzimas na panificação tem se expandido como uma estratégia tecnológica eficaz para aprimorar a qualidade de produtos sem glúten, atendendo à crescente demanda por ingredientes naturais e com o conceito de "rótulo limpo" (*clean label*). Diferente de muitos aditivos químicos, as enzimas são catalisadores biológicos altamente específicos que atuam durante as etapas de preparo e forneamento, e por serem proteínas, são desnaturadas pelo calor do cozimento e não permanecem

ativas ou identificáveis no produto final (SARABHAI; TAMILSELVAN; PRABHASANKAR, 2021). Geralmente obtidas por fermentação microbiana, sua funcionalidade na massa depende do controle rigoroso de variáveis como pH, temperatura e tempo de processamento.

Em formulações isentas de glúten, as enzimas desempenham um papel vital como condicionadores que melhoram a processabilidade e as propriedades reológicas da massa (BENDER; SCHÖNLECHNER, 2020), atuando na decomposição de componentes como amido, proteínas, fibras e lipídios (DAHIYA *et al.*, 2020).

Diferentes enzimas têm sido associadas à melhoria da qualidade tecnológica e sensorial de pães sem glúten. A amilase, transglutaminase (TGase), protease e glicose oxidase, por exemplo, são amplamente reconhecidas por aumentar o volume específico e reduzir a firmeza, melhorando atributos como elasticidade, coesão e maciez (SADEGHIAN MOTAHAR *et al.*, 2021; SUTRISNO *et al.*, 2025). Outras enzimas, como a lacase, contribuem para a melhoria da textura e cor em pães (ALIZADEH-BAHAABADI *et al.*, 2022). Além disso, a aplicação de coquetéis enzimáticos, combinando xilanases, amilases e celulasas, pode gerar efeitos sinérgicos que potencializam a maciez e mantêm a estabilidade do produto durante o armazenamento (BEN HMAD *et al.*, 2024).

Dessa forma, a biotecnologia enzimática representa um caminho promissor e inovador para superar os desafios estruturais das massas sem glúten.

7. Farinha de banana verde

A banana (*Musa* spp.), pertencente à família Musaceae, é uma das frutas mais consumidas em todo o mundo (MERCÊS *et al.*, 2025). Podem ser classificadas em bananas de mesa, que são geralmente consumidas *in natura*, em estágio avançado de maturação, enquanto as bananas-da-terra ou plátanos são predominantemente consumidas após cocção, podendo ser utilizadas em diferentes estágios de maturação (SHINI *et al.*, 2024).

Em 2024, a produção mundial atingiu aproximadamente 139,41 milhões de toneladas, sendo a Ásia responsável por cerca de 52% desse total e consolidando-se como a principal região produtora (FAO, 2024) (Figura 22).

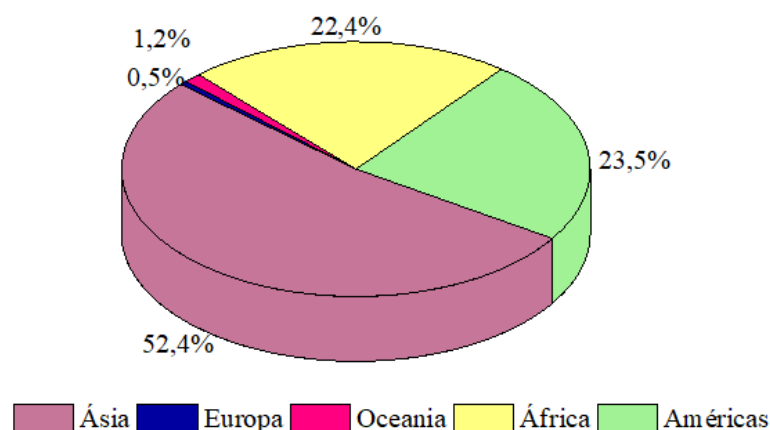


Figura 22- Principais regiões produtoras de banana no mundo em 2024. **Fonte:** FAO, 2024.

Entre os países, a Índia lidera o ranking global, com cerca de 37,61 milhões de toneladas, enquanto o Brasil ocupa a quinta posição, com aproximadamente 7,05 milhões de toneladas (FAO, 2024) (Figura 23). No cenário nacional, o estado de São Paulo se destaca como o maior produtor, alcançando cerca de 963,64 mil toneladas (IBGE, 2024).

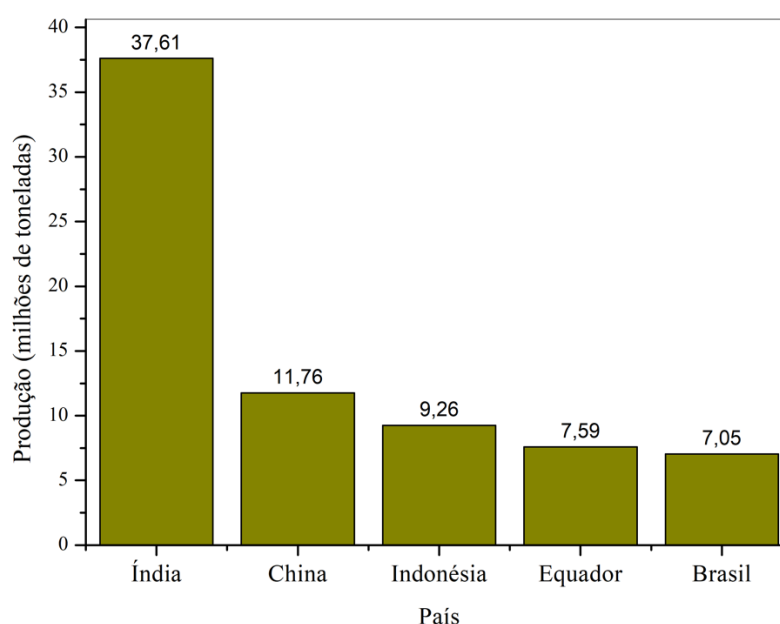


Figura 23- Ranking dos cinco maiores produtores de banana no mundo em 2024. **Fonte:** FAO, 2024.

A banana é uma fruta climatérica e, após o amadurecimento, apresenta elevada perecibilidade, o que favorece a ocorrência de perdas ao longo de diferentes etapas da cadeia produtiva, incluindo colheita, transporte, armazenamento e comercialização (FEITOSA *et al.*,

2023). Além disso, uma parcela significativa dos frutos é descartada durante os processos de seleção e classificação para exportação, por não atender aos padrões de qualidade exigidos pelo mercado. Como consequência, grandes volumes de resíduos são gerados, resultando em prejuízos econômicos para produtores e indústrias (KUMAR *et al.*, 2019).

Nesse contexto, a produção de farinha a partir de frutos verdes tem sido apontada como uma estratégia promissora para reduzir essas perdas. As etapas tecnológicas envolvidas nesse processamento estão detalhadas no esquema de produção da Figura 24.



Figura 24- Processo de obtenção da farinha de banana verde. **Fonte:** A autora.

Além de favorecer o aproveitamento dessa matéria-prima, essa farinha tem despertado crescente interesse para aplicação no desenvolvimento de alimentos com apelo funcional. A farinha de banana verde (FBV) apresenta composição nutricional relevante, caracterizando-se pelo elevado teor de fibras alimentares, vitaminas, minerais e compostos bioativos, especialmente compostos fenólicos além de quantidades expressivas de amido resistente (AR) tipo 2 (MERCÊS *et al.*, 2025).

O AR é amplamente reconhecido por apresentar comportamento fisiológico semelhante ao das fibras alimentares, uma vez que resiste à ação das enzimas digestivas no intestino delgado e é fermentado pela microbiota no intestino grosso, podendo exercer efeitos prebióticos. Estudos demonstraram que seu consumo está associado a inúmeros benefícios à saúde, como no tratamento e prevenção de diabetes Tipo II, hipertensão, obesidade, controle do índice

glicêmico, colesterol e prevenção do câncer colorretal (DAS *et al.*, 2022; ROSADO *et al.*, 2020; WANG; WANG; XIAO, 2018).

Além do perfil nutricional, a FBV apresenta importantes propriedades tecnofuncionais, incluindo elevado teor de amilose, alta capacidade de retenção de água e de intumescimento, bem como boa estabilidade térmica, características que favorecem sua aplicação em produtos de panificação (CHEL-GUERRERO *et al.*, 2026; KUMAR *et al.*, 2019).

Em função dessas características, a FBV tem sido explorada na elaboração de diferentes produtos alimentícios, conforme apresentado na Tabela 11.

Tabela 11- Diferentes aplicações da farinha de banana verde.

Aplicação	Referência
Pães	(AMINI KHOOZANI; KEBEDE; EL-DIN AHMED BEKHIT, 2020; CARLIER <i>et al.</i> , 2025)
Bolos	(SEGUNDO <i>et al.</i> , 2017)
Leite fermentado	(BATISTA <i>et al.</i> , 2017)
Linguças	(ALVES <i>et al.</i> , 2016)
Hambúrguer	(BASTOS <i>et al.</i> , 2014)
Cupcakes	(SUWEERANON <i>et al.</i> , 2025)
Biscoitos	(HUANG <i>et al.</i> , 2026)
Produtos cárneos	(STRAGLIOTTO <i>et al.</i> , 2022)
Massas	(ISLAM <i>et al.</i> , 2025)
Donuts	(CHEL-GUERRERO <i>et al.</i> , 2026)

Entretanto, as propriedades tecnológicas e nutricionais da FBV podem variar de acordo com fatores como o estágio de maturação dos frutos, as condições de pré-processamento (RAMMOHAN *et al.*, 2025), a utilização ou não da casca (VIANA *et al.*, 2024), o genótipo empregado (SHINI *et al.*, 2024), e método de secagem adotado (GUADALUPE-MOYANO *et al.*, 2022).

Diante desse cenário, a FBV destaca-se como uma matéria-prima promissora para o desenvolvimento de produtos alimentícios com maior valor nutricional e funcional, especialmente em formulações destinadas à dietas isentas de glúten.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A revisão bibliográfica evidenciou que resíduos agroindustriais representam recursos renováveis promissores para a obtenção de produtos de maior valor agregado, contribuindo para a valorização da biomassa lignocelulósica e para o desenvolvimento de processos alinhados aos princípios da sustentabilidade. Nesse contexto, a produção de enzimas por fermentação em estado sólido destaca-se como uma estratégia eficiente, uma vez que permite o aproveitamento de substratos de baixo custo e favorece a síntese de biocatalisadores com potencial aplicação industrial.

Entre essas enzimas, as hemicelulases, como a β -mananase, apresentam papel relevante na despolimerização de componentes da hemicelulose, possibilitando a conversão de biomassa em compostos de interesse e ampliando as perspectivas de utilização de resíduos lignocelulósicos em processos biotecnológicos. Paralelamente, a literatura destaca que enzimas e hidrocolóides podem ser utilizados como ferramentas tecnológicas para melhorar as propriedades estruturais de produtos sem glúten, cuja qualidade é frequentemente limitada pela ausência da rede viscoelástica formada pelo glúten.

Dessa forma, os conceitos discutidos no referencial teórico reforçam o potencial da integração entre bioprocessos e tecnologia de alimentos, demonstrando que a produção enzimática a partir de resíduos agroindustriais pode contribuir tanto para a valorização de biomassa quanto para o desenvolvimento de ingredientes e estratégias capazes de aprimorar a qualidade tecnológica de alimentos, especialmente em sistemas complexos como os produtos de panificação sem glúten.

O presente trabalho apresenta um enfoque inédito no âmbito do Laboratório de Biotransformação e Biocatálise Orgânica (LaBioCat), que já possui experiência consolidada na produção e aplicação de enzimas por fermentação em estado sólido. Contudo, esta pesquisa representa a primeira investigação do grupo voltada à produção de β -mananase associada à sua aplicação em uma matriz alimentar e em processos de sacarificação, configurando uma contribuição original tanto para a biotecnologia enzimática quanto para a ciência e tecnologia de alimentos.

Além disso, a utilização de resíduos como casca da amêndoa de cacau, casca de tamarindo e ora-pro-nóbis como substratos para a fermentação em estado sólido evidencia uma abordagem inovadora e alinhada ao aproveitamento sustentável de recursos regionais subutilizados. A integração entre produção enzimática, valorização de resíduos e aplicação tecnológica reforça o caráter interdisciplinar e aplicado da pesquisa, além de ampliar as perspectivas para investigações futuras voltadas ao desenvolvimento de processos e produtos de interesse industrial.

REFERÊNCIAS

- AFEDZI, A. E. K.; OBENG-BOATENG, F.; ADUAMA-LARBI, M. S.; ZHOU, X.; XU, Y. Valorization of Ghanaian cocoa processing residues as extractives for value-added functional food and animal feed additives – A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 52, p. 102835, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102835>
- AGHAEI, S.; KARIMI ALAVIJEH, M.; SHAFIEI, M.; KARIMI, K. A comprehensive review on bioethanol production from corn stover: Worldwide potential, environmental importance, and perspectives. **Biomass and Bioenergy**, v. 161, p. 106447, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2022.106447>
- AGRAWAL, S.; CHAVAN, P.; BADIGER, A. Marine fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*: A promising reservoir of chemical diversity for developing anti-viral drug candidates. **The Microbe**, v. 3, p. 100081, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100081>
- AHIRWAR, S.; SONI, H.; RAWAT, H. K.; GANAIE, Mohd. A.; PRANAW, K.; KANGO, N. Production optimization and functional characterization of thermostable β -mannanase from *Malbranchea cinnamomea* NFCCI 3724 and its applicability in mannotetraose (M4) generation. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 63, p. 344–353, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.03.033>
- AHMED, M. J.; DANISH, M.; ANASTOPOULOS, I.; IWUOZOR, K. O. Recent progress on corn (*Zea mays* L.)-based materials as raw, chemically modified, carbonaceous, and composite adsorbents for aquatic pollutants: A review. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 172, p. 106004, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2023.106004>
- AITA, B. C.; SPANNEMBERG, S. S.; SCHMALTZ, S.; ZABOT, G. L.; TRES, M. V.; KUHN, R. C.; MAZUTTI, M. A. Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 3, p. 103193, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103193>
- AKANIRO, I. R.; CHIBUIKE, I. V.; ONWUJEKWE, E. C.; GBADAMOSI, F. A.; ENYI, D. O.; ONWE, O. N. *Penicillium* species as chassis for biomanufacturing and environmental sustainability in the modern era: Progress, challenges, and future perspective. **Fungal Biology Reviews**, v. 46, p. 100326, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2023.100326>
- ALMEIDA LESSA, O. *et al.* Structural alteration of cocoa bean shell fibers through biological treatment using *Penicillium roqueforti*. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 53, n. 9, p. 1154–1163, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2023.2177866>
- ALVES, A. N.; NASCIMENTO, P. A.; FONTAN, R. D. C. I.; SOUSA JÚNIOR, E. C.; BONOMO, P.; VELOSO, C. M.; BONOMO, R. C. F. Extraction of protease from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) and partial purification in polyethylene glycol + sodium phosphate aqueous two-phase system. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, n. 2, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfpp.16266>. Acesso em: 27 jun. 2025.
- AMARAL, T. N.; JUNQUEIRA, L. A.; PRADO, M. E. T.; CIRILLO, M. A.; DE ABREU, L. R.; COSTA, F. F.; DE RESENDE, J. V. Blends of *Pereskia aculeata* Miller mucilage, guar gum, and gum Arabic added to fermented milk beverages. **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 331–342, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.01.009>

- ANDOH-MENSAH, E.; ANTHONIO, C. K.; SOSSAH, F. L.; FIANKO, D. A.; YANKEY, E. N. Integrated soil fertility management using cocoa bean shells improves soil chemical properties, coconut yield and mitigates environmental pollution. **Journal of Cleaner Production**, v. 428, p. 139418, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.139418>
- ARYA, P. S.; YAGNIK, S. M.; RAJPUT, K. N.; PANCHAL, R. R.; RAVAL, V. H. Valorization of agro-food wastes: Ease of concomitant-enzymes production with application in food and biofuel industries. **Bioresource Technology**, v. 361, p. 127738, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127738>
- ASHOK, B.; HARIRAM, N.; SIENGCHIN, S.; RAJULU, A. V. Modification of tamarind fruit shell powder with in situ generated copper nanoparticles by single step hydrothermal method. **Journal of Bioresources and Bioproducts**, v. 5, n. 3, p. 180–185, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2020.07.003>
- BANGORIA, P.; DIVECHA, J.; SHAH, A. R. Production of mannooligosaccharides producing β -Mannanase by newly isolated *Penicillium aculeatum* APS1 using oil seed residues under solid state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 34, p. 102023, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102023>
- BARAKA, F.; LANGARI, M. M.; BEITIA, I.; DÁVILA, I.; LABIDI, J.; MORALES, A.; SILLERO, L. Enhancing lignocellulosic biomass pretreatment with choline chloride-based deep eutectic solvents. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 13, n. 3, p. 117087, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.117087>
- BAREKATAIN, R.; HALL, L.; CHRYSTAL, P. V.; FICKLER, A. Nutrient utilisation and growth performance of broiler chickens fed standard or moderately reduced dietary protein diets with and without β -mannanase supplementation. **Animal Nutrition**, v. 19, p. 131–138, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2024.05.008>
- BARUA, S.; SAHU, D.; SULTANA, F.; BARUAH, S.; MAHAPATRA, S. Bioethanol, internal combustion engines and the development of zero-waste biorefineries: an approach towards sustainable motor spirit. **RSC Sustainability**, v. 1, n. 5, p. 1065–1084, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D3SU00080J>
- BASMAK, S.; TURHAN, I. Production of β -mannanase, inulinase, and oligosaccharides from coffee wastes and extracts. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 261, p. 129798, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129798>
- BATISTA, G. A.; SILVA, L. G. M. D.; PEREIRA, M. D. A.; BATISTA, A. S.; MEIRA, A. C. F. D. O.; COSTA, C. A. R. D.; PAIVA, T. S.; PIO, L. A. S.; RESENDE, J. V. D. Use of Ora-Pro-Nobis (*Pereskia aculeata* miller) mucilage as a substitute for commercial pectin in jaboticaba jelly production. **OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA**, v. 23, n. 4, p. e9536, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.55905/oelv23n4-064>
- BAYRAM, O.; MORAL, E.; KÖKSAL, E.; GÖDE, F.; PEHLIVAN, E. Removal of methyl blue and malachite green from water using biodegradable magnetic Tamarindus Indica fruit seed biochar: Characterization, equilibrium study, modelling and thermodynamics. **Sustainable Chemistry for the Environment**, v. 3, p. 100023, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scenv.2023.100023>
- BOGGIONE, M. J.; ALLASIA, M. B.; AGUILAR, C. N.; FARRUGGIA, B. Valorization of corn cob for the obtention and purification of endoglucanase produced by SSF. **Process Biochemistry**,

v. 88, p. 106–112, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.09.026>

BORGES-MACHADO, A. L.; RIBEIRO-SANCHES, M. A.; NEVES-MARTINS, M. J.; DOS SANTOS, P. A.; LUNA-SOLANO, G.; TELIS-ROMERO, J. Water desorption isotherms and thermodynamic properties of Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller). **LWT**, v. 193, p. 115749, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.115749>

C, T. *et al.* Effective reduction of carbon-containing pollutants in coffee cherry pulping wastewater using natural polysaccharide from *Tamarindus indica* L. seeds. **Environmental Research**, v. 259, p. 119527, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.119527>

CERDA, A.; GEA, T.; VARGAS-GARCÍA, M. C.; SÁNCHEZ, A. Towards a competitive solid state fermentation: Cellulases production from coffee husk by sequential batch operation and role of microbial diversity. **Science of The Total Environment**, v. 589, p. 56–65, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.184>

CHAUHAN, P. S.; PURI, N.; SHARMA, P.; GUPTA, N. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 5, p. 1817–1830, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3887-5>

CHAVAPRADIT, C.; VISESSANGUAN, W.; PANJANAPONGCHAI, S.; ANAL, A. K. Techno-Functional Properties and Potential Applications of Peptides from Agro-Industrial Residues. **Journal of Renewable Materials**, v. 13, n. 3, p. 553–582, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.32604/jrm.2025.058857>

CHAVES, J. M. S. *et al.* Enzymatic blend containing β -glucosidase from *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 grown on cocoa pod husk: Characterization and utilization in rice husk saccharification. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 102, n. 1, p. 101551, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jics.2024.101551>

CHEN, H.; ZENG, Z.; LAL, R.; WU, J.; CHEN, J.; LI, M.; CAO, L.; LIU, X.; ZHANG, R.; GONG, C. Acetic acid production from corn straw via enzymatic degradation using putative acetyl esterase from the metagenome assembled genome. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 187, p. 110619, 2025 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2025.110619>

CHEN, X.; FU, W.; HU, K.; YIN, G.; LIU, S.; ZHU, N.; ZHAO, Y.; CUI, Z.; YUAN, X. Economic and environmental analysis: Straw biogas project operating at full load with dry yellow corn straw. **Bioresource Technology**, v. 426, p. 132335, 2025 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2025.132335>

CHEN, X.; LI, Y.; CHENG, P.; WANG, H.; NIAN, T. Green utilization of corn straw: Prediction of bio-oil liquefaction yield and application of bio-oil in asphalt. **Industrial Crops and Products**, v. 224, p. 120304, 2025 c. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120304>

CHEN, X.; YING, Z.; SUN, H.; ZHENG, X.; DOU, B.; CUI, G. Comparison of three-component co-pyrolytic char and corn straw biochar for assisting water electrolysis to achieve efficient hydrogen production. **Journal of Power Sources**, v. 630, p. 236138, 2025 d. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2024.236138>

CHEN, X.; ZHU, J.; TIAN, Y.; WANG, Z.; PAN, J.; ZHAN, Y.; SONG, W. Lignin-derived deep eutectic solvent for enhanced corn straw pretreatment: Boosting enzymatic hydrolysis and biohydrogen production. **Industrial Crops and Products**, v. 229, p. 120976, 2025 e. Disponível

em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2025.120976>

CHINTA, M. L.; GANDAM, P. K.; SIVASANKAR, M. V.; PARCHA, S. R. Tamarind (*Tamarindus indica* L.) Seed Polysaccharide: A promising biopolymer for drug delivery, wound healing, tissue engineering and beyond. **Carbohydrate Research**, v. 552, p. 109454, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2025.109454>

CONCEIÇÃO, M. C.; JUNQUEIRA, L. A.; GUEDES SILVA, K. C.; PRADO, M. E. T.; DE RESENDE, J. V. Thermal and microstructural stability of a powdered gum derived from *Pereskia aculeata* Miller leaves. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 104–114, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.02.015>

COSTA, D. A. L.; WILLIAMS, T. C. R.; DO VALE, L. H. F.; FILHO, E. X. F. Characterization of mannanases from *Clonostachys byssicola* involved in the breakdown of lignocellulosic substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 50, p. 102680, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102680>

COTON, E.; COTON, M.; HYMERY, N.; MOUNIER, J.; JANY, J.-L. *Penicillium roqueforti*: an overview of its genetics, physiology, metabolism and biotechnological applications. **Fungal Biology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 59–73, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.03.001>

COTON, E.; JANY, J.-L.; COTON, M. *Penicillium roqueforti*. In: **Encyclopedia of Dairy Sciences**. [S. l.]: Elsevier, 2022. p. 599–606. E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.01092-1>. Acesso em: 27 jun. 2025.

DA CRUZ, G. S. *et al.* Cereal bar enriched with ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller): physicochemical and sensory characterization. **Journal of Food Science and Technology**, v. 61, n. 8, p. 1547–1556, 2024 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-024-05924-2>

DA CRUZ, T. P.; WERNICK, B.; KOZU, A. Y. K.; GONÇALVES, G. S.; FURUYA, V. R. B.; ADESHINA, I.; GATLIN, D. M.; FURUYA, W. M. Dietary β -mannanase supplementation decreases digesta viscosity, improves growth and modulates gut microbiota in juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fed a soybean meal-based diet. **Aquaculture**, v. 583, p. 740606, 2024 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740606>

DA SILVA NUNES, N. *et al.* Simplex-Centroid Design and Artificial Neural Network-Genetic Algorithm for the Optimization of Exoglucanase Production by *Penicillium Roqueforti* ATCC 10110 Through Solid-State Fermentation Using a Blend of Agroindustrial Wastes. **BioEnergy Research**, v. 13, n. 4, p. 1130–1143, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10157-0>

DA SILVA SOUZA, M. *et al.* Fermented cocoa bean shell by-product as an enhanced adsorbent for dye of the textile industry. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-024-05913-7>. Acesso em: 27 jun. 2025.

DAS NEVES, C. A.; DE MENEZES, L. H. S.; SOARES, G. A.; DOS SANTOS REIS, N.; TAVARES, I. M. C.; FRANCO, M.; DE OLIVEIRA, J. R. Production and biochemical characterization of halotolerant β -glucosidase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 grown in forage palm under solid-state fermentation. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, n. 8, p. 3133–3144, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00930-8>

DAVID, A.; SINGH CHAUHAN, P.; KUMAR, A.; ANGURAL, S.; KUMAR, D.; PURI, N.;

GUPTA, N. Coproduction of protease and mannanase from *Bacillus nealsonii* PN-11 in solid state fermentation and their combined application as detergent additives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 1176–1184, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.037>

DAWOOD, A.; MA, K. Applications of Microbial β -Mannanases. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 598630, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.598630>

DE ALMEIDA ANTUNES FERRAZ, J. L.; SOUZA, L. O.; SOARES, G. A.; COUTINHO, J. P.; DE OLIVEIRA, J. R.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; 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**, v. 248, p. 214–220, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.048>

DE MENEZES, L. H. S.; RAMOS, M. R. M. F.; ARAUJO, S. C.; SANTO, E. L. D. E.; OLIVEIRA, P. C.; TAVARES, I. M. D. C.; SANTOS, P. H.; FRANCO, M.; DE OLIVEIRA, J. R. Application of a constrained mixture design for lipase production by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 under solid-state fermentation and using agro-industrial wastes as substrate. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 52, n. 8, p. 885–893, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2021.2004547>

DE MORAIS, L. C.; DE OLIVEIRA MEIRA, A. C. F.; FREITAS, T. D.; ALVES, J. G. L. F.; BOTREL, D. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; DE RESENDE, J. V. Microparticles of *Pereskia aculeata* miller mucilage and sodium alginate for the encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 311, p. 143755, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.143755>

DE MORAIS, L. C.; FERREIRA, I. A. F.; DE OLIVEIRA MEIRA, A. C. F.; VERÍSSIMO, L. A. A.; DE RESENDE, J. V. Synthesis and characterization of hydrogels from alginate and ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) mucilage. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 140, n. 42, p. e54568, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/app.54568>

DEL RÍO, P. G.; GULLÓN, B.; WU, J.; SADDLER, J.; GARROTE, G.; ROMANÍ, A. Current breakthroughs in the hardwood biorefineries: Hydrothermal processing for the co-production of xylooligosaccharides and bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 343, p. 126100, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126100>

DENG, Z.; XIA, A.; ZHANG, Z.; ZHU, X.; HUANG, Y.; ZHU, X.; LIAO, Q. A continuous hydrothermal pretreatment system for efficient sugar production from wheat straw. **Chemical Engineering Journal**, v. 508, p. 160867, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2025.160867>

DHARMESH, A.; RANI, P.; SHARMA, A. K. Tamarind peel-derived nitrogen-doped porous carbon: A sustainable sulfur host for enhanced lithium–sulfur battery performance. **Journal of Power Sources**, v. 634, p. 236429, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2025.236429>

DISCA, V.; CAPUANO, E.; ARLORIO, M. Colonic fermentation of enzymatically treated cocoa bean shells (CBSs) and short chain fatty acids (SCFAs) production. **LWT**, v. 202, p. 116311, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116311>

DIVAKARAN, D.; SUYAMBULINGAM, I.; SANJAY, M. R.; RAGHUNATHAN, V.;

APPAN, V.; SIENGCHIN, S. Isolation and characterization of microcrystalline cellulose from an agro-waste tamarind (*Tamarindus indica*) seeds and its suitability investigation for biofilm formulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 254, p. 127687, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127687>

DU, X.; ZHOU, Y.; ZHOU, Q.; CHEN, Q.; ZHANG, Q.; XU, W.; ZHAN, Y.; JIANG, M. A clean deconstruction of steam-exploded corn straw into high purity cellulose nanosheets and well-defined lignin nanotubes. **Industrial Crops and Products**, v. 222, p. 119765, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119765>

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Production quantities of Maize (corn) by country. FAOSTAT: Crops and livestock products. Rome, 2024. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acesso em: 23 maio. 2025.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179–188, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.092>

FILIPPE, D.; FERNANDES, H.; CASTRO, C.; PERES, H.; OLIVA-TELES, A.; BELO, I.; SALGADO, J. M. Improved lignocellulolytic enzyme production and antioxidant extraction using solid-state fermentation of olive pomace mixed with winery waste. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 14, n. 1, p. 78–91, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bbb.2073>

GARCIA, J. A. A.; CORRÊA, R. C. G.; BARROS, L.; PEREIRA, C.; ABREU, R. M. V.; ALVES, M. J.; CALHELHA, R. C.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Phytochemical profile and biological activities of “Ora-pro-nobis” leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest. **Food Chemistry**, v. 294, p. 302–308, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.074>

GARRIDO-GALAND, S.; ASENSIO-GRAU, A.; CALVO-LERMA, J.; HEREDIA, A.; ANDRÉS, A. The potential of fermentation on nutritional and technological improvement of cereal and legume flours: A review. **Food Research International**, v. 145, p. 110398, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110398>

Grand View Research. Brazil Corn and Corn Starch Derivatives Market Size & Outlook.

Grand View Research. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/horizon/outlook/corn-and-corn-starch-derivatives-market/brazil>. Acesso em: 25 mai. 2025b.

Grand View Research. Corn Ethanol - Corn and Corn Starch Derivatives Market Statistics.

Grand View Research. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/horizon/statistics/corn-cornstarch-derivatives-market-report/corn-starch-derivatives/corn-ethanol/global>. Acesso em: 25 mai. 2025c.

Grand View Research. Global Cocoa Beans Market Size & Outlook, 2023–2030. Grand View

Research. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/horizon/outlook/cocoa-beans-market-size/global>. Acesso em: 06 jun. 2025a.

GRAVIER-RODRÍGUEZ, G.; JURADO-BASANTE, S.; ARIAS-CONTRERAS, A. N.; GAMARRA CASTILLO, O. J.; PORRAS, A.; SÁNCHEZ-CAMARGO, A. D. P. Ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from Andean blackberry and their use as an indicator in sustainable smart biofilms developed with cocoa bean shells as natural fiber-filled PLA composite materials. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 40, p. 101165, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2023.101165>

GUO, W. H.; MA, L.; SUN, X. H.; FAN, Y. Y.; ZHANG, J. B.; ZHENG, Z. B.; LIU, S. H. Novel calcium lactate-activated biochar derived from corn straw for tenuazonic acid removal: Adsorbent preparation, adsorption mechanisms, and real application. **Microchemical Journal**, v. 213, p. 113583, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2025.113583>

HASHEM, Md. A.; BITHI, E. J.; AHMED, N.; ISLAM, S.; MIEM, Md. M. Dye adsorption from tannery wastewater on *Tamarindus indica* seed adsorbent. **Water-Energy Nexus**, v. 8, p. 45–54, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wen.2025.03.003>

HOFF, R.; DAGUER, H.; DEOLINDO, C. T. P.; DE MELO, A. P. Z.; DURIGON, J. Phenolic compounds profile and main nutrients parameters of two underestimated non-conventional edible plants: *Pereskia aculeata* Mill. (ora-pro-nóbis) and *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke (tarumã) fruits. **Food Research International**, v. 162, p. 112042, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112042>

HOUANKPO, T. O. N.; MA, Z.; ZHAO, Z.; TIAN, G. Performance of cementitious high-pressure mixtures with wheat and corn straw fiber and straw ashes. **Case Studies in Construction Materials**, v. 22, p. e04175, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cscm.2024.e04175>

HOUFANI, A. A.; ANDERS, N.; SPIESS, A. C.; BALDRIAN, P.; BENALLAOUA, S. Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars— a review. **Biomass and Bioenergy**, v. 134, p. 105481, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105481>

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Milho em grão: produção agropecuária. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/milho-em-grao/br>. Acesso em: 25 mai. 2025b.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cacau: produção agropecuária. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/cacau/br>. Acesso em: 06 jun. 2025a.

INTIYA, W.; HATTHAPANIT, K.; THAPTONG, P.; SAE-OUI, P. Application of Tamarind Shell as a Green Additive in Natural Rubber. **Polymers**, v. 16, n. 4, p. 493, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym16040493>

ISMAIL, S. A.; HASSAN, A. A.; EMRAN, M. A. Economic production of thermo-active endo β -mannanase for the removal of food stain and production of antioxidant manno-oligosaccharides. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101387, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101387>

JANA, U. K.; PANDEY, D.; KANGO, N. Advances in the utilization of mannan-rich agricultural

wastes and gums for the circular bioeconomy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 217, p. 115713, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2025.115713>

JIANG, P.; ZHOU, L.; HAN, Y.; FU, W.; SU, S.; ZENG, M. Utilizing waste corn straw to photodegrade methyl orange and methylene blue: Photothermal effect of biochar enhances photodegradation efficiency. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 12, n. 3, p. 112914, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.112914>

KASIFAH, K.; BILAD, M. R.; BAJA, S. Application of rice straw and corn straw compost for enhancing phosphorus availability in ultisol and corn plants. **Cleaner Waste Systems**, v. 10, p. 100213, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clwas.2025.100213>

KAUR, J.; CHUGH, P.; SONI, R.; SONI, S. K. A low-cost approach for the generation of enhanced sugars and ethanol from rice straw using in-house produced cellulase-hemicellulase consortium from *A. niger* P-19. **Bioresource Technology Reports**, v. 11, p. 100469, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100469>

KHASWAL, A.; MISHRA, S. K.; CHATURVEDI, N.; SAINI, S.; PLETSCHKE, B.; KUHAD, R. C. Microbial enzyme production: Unlocking the potential of agricultural and food waste through solid-state fermentation. **Bioresource Technology Reports**, v. 27, p. 101880, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2024.101880>

KIARIE, E. G.; CHENG, V.; NJERI, F. M.; BAKHSHALINEJAD, R.; AMERAH, A. M.; FICKLER, A.; SOKALE, A. O. Egg production, nutrient utilization and metabolism in Lohmann LSL lite hens fed corn and soybean meal-based diet supplemented with multiple doses of single β -mannanase from 63 to 83 weeks of age. **Poultry Science**, v. 104, n. 8, p. 105285, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2025.105285>

KUKRETI, N.; KUMAR, P.; KATARIA, R. Sustainable biotransformation of lignocellulosic biomass to microbial enzymes: An overview and update. **Industrial Crops and Products**, v. 222, p. 119432, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119432>

KUMAR, N.; SAINI, H.; AGGARWAL, N. K.; JANGRA, N.; DHIMAN, K.; SANGWAN, I. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass as a sustainable option for biofuel production. **Next Sustainability**, v. 5, p. 100133, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nxsust.2025.100133>

KUMAR, V.; AHLUWALIA, V.; SARAN, S.; KUMAR, J.; PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R. Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions. **Bioresource Technology**, v. 323, p. 124566, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124566>

LAGO, A. M. T.; NEVES, I. C. O.; OLIVEIRA, N. L.; BOTREL, D. A.; MINIM, L. A.; DE RESENDE, J. V. Ultrasound-assisted oil-in-water nanoemulsion produced from *Pereskia aculeata* Miller mucilage. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 50, p. 339–353, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.09.036>

LEE, S. E.; LIM, J. S.; PARK, Y.-K.; SHONG, B.; LEE, H. Utilizing cocoa bean husk residues from supercritical extraction for biofuel production through hydrothermal liquefaction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 215, p. 106416, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2024.106416>

LEITE, P.; BELO, I.; SALGADO, J. M. Co-management of agro-industrial wastes by solid-state

fermentation for the production of bioactive compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 172, p. 113990, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113990>

LI, X.-J.; ZHAO, Y.-Y.; TAN, Q.-W.; HAN, Z.-H.; TANG, B.; WANG, Y.-Z.; SONG, F. Corn straw cellulose nanocrystals: Preparation, structural coloration, and high-level anti-counterfeiting. **Industrial Crops and Products**, v. 224, p. 120393, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120393>

LI, Z.; WAGHMARE, P. R.; DIJKHUIZEN, L.; MENG, X.; LIU, W. Research advances on the consolidated bioprocessing of lignocellulosic biomass. **Engineering Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 100139, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.engmic.2024.100139>

LIANG, J.; ZHANG, P.; CHEN, L.; CHANG, J.; ZHANG, R.; ZHANG, G.; TIAN, Y. Effect of high corn straw loads on short-chain fatty acid production in semi-continuous rumen reactor. **Bioresource Technology**, v. 395, p. 130396, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130396>

LIAO, H.; FENG, B.; YING, W.; LIAN, Z.; ZHANG, J. Novel approach for corn straw biorefineries: Production of xylooligosaccharides, lignin and ethanol by nicotinic acid hydrolysis and pentanol pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 395, p. 130352, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130352>

LIM, J. S.; LEE, S. E.; SHONG, B.; PARK, Y.-K.; LEE, H. Valorization of cocoa bean shell residue from supercritical fluid extraction through hydrothermal carbonization for porous material production. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 221, p. 106550, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2025.106550>

LIMA PARENTE FERNANDES, M.; ALCÂNTARA VERÍSSIMO, L. A.; CRISTINA DE SOUZA, A.; SCHWAN, R. F.; RIBEIRO DIAS, D. Low-cost agro-industrial sources as a substrate for the production of l-asparaginase using filamentous fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 34, p. 102037, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102037>

LIU, J.; WANG, C.; ZHAO, X.; YIN, F.; YANG, H.; WU, K.; LIANG, C.; YANG, B.; ZHANG, W. Bioethanol production from corn straw pretreated with deep eutectic solvents. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 62, p. 27–35, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2022.12.004>

LU, Y.; JIANG, M.; PAN, Y.; WANG, F.; XU, W.; ZHOU, Y.; DU, X. Preparation of Ag@lignin nanotubes for the development of antimicrobial biodegradable films from corn straw. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 254, p. 127630, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127630>

LUENGTHANAPHOL, S.; MONGKHOLKHAJORNILP, D.; DOUGLAS, S.; DOUGLAS, P. L.; PENG SOPA, L.; PONGAMPHAI, S. Extraction of antioxidants from sweet Thai tamarind seed coat—preliminary experiments. **Journal of Food Engineering**, v. 63, n. 3, p. 247–252, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2003.07.006>

MACIEL, V. B. V.; BEZERRA, R. Q.; CHAGAS, E. G. L. D.; YOSHIDA, C. M. P.; CARVALHO, R. A. D. Ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller): a potential alternative for iron supplementation and phytochemical compounds. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, p. e2020180, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.18020>

MACIEL, V. B. V.; YOSHIDA, C. M. P.; BOESCH, C.; GOYCOOLEA, F. M.; CARVALHO, R.

- A. Iron-rich chitosan-pectin colloidal microparticles laden with ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) extract. **Food Hydrocolloids**, v. 98, p. 105313, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105313>
- MAIBAM, P. D.; GOYAL, A. Bioethanol production from delignified rice straw by using a novel crude recombinant enzyme cocktail in pre-saccharification simultaneous saccharification and fermentation process. **Process Biochemistry**, v. 153, p. 26–33, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2025.03.005>
- MAIBAM, P. D.; GOYAL, A. Designing of recombinant hydrolytic enzymes cocktail for effective saccharification of delignified rice straw. **Industrial Crops and Products**, v. 206, p. 117727, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117727>
- MALGAS, S.; VAN DYK, S. J.; PLETSCHE, B. I. β -Mannanase (Man26A) and α -galactosidase (Aga27A) synergism – A key factor for the hydrolysis of galactomannan substrates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 70, p. 1–8, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.007>
- MANSINGH, B. B.; BINOJ, J. S.; SAI, N. P.; HASSAN, S. A.; SIENGCHIN, S.; SANJAY, M. R.; LIU, Y. C. Sustainable development in utilization of *Tamarindus indica* L. and its by-products in industries: A review. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, v. 4, p. 100207, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2021.100207>
- MARGELLOU, A. G.; PAPPA, C. P.; PSOCHIA, E. A.; PETALA, M. D.; TRIANTAFYLLIDIS, K. S. Mild isolation and characterization of surface lignin from hydrothermally pretreated lignocellulosic forestry and agro-industrial waste biomass. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 33, p. 101056, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101056>
- MARTIN, A. A.; DE FREITAS, R. A.; SASSAKI, G. L.; EVANGELISTA, P. H. L.; SIERAKOWSKI, M. R. Chemical structure and physical-chemical properties of mucilage from the leaves of *Pereskia aculeata*. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 20–28, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.020>
- MATOS, É. J. A.; NOVODWORSKI, J.; GONÇALVES, R. M.; URBINATI, E. C.; BOMBARDELLI, R. A.; MEURER, F. Inclusion of Ora-Pro-Nóbis (*Pereskia aculeata*) Leaf Meal in the Diet of Adult Nile Tilapia Improves Growth Performance and Intestinal Absorption Capacity Without Compromising Metabolic and Hematological Variables. **Veterinary Sciences**, v. 12, n. 1, p. 15, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vetsci12010015>
- MENDES, J. F.; DE LIMA FONTES, M.; BARBOSA, T. V.; PASCHOALIN, R. T.; MATTOSO, L. H. C. Membranes composed of poly(lactic acid)/poly(ethylene glycol) and Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) extract for dressing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 268, p. 131365, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131365>
- MEZA-SEPÚLVEDA, D. C.; HERNANDEZ-URREA, C.; VALENCIA-SANCHEZ, H. Thermochemical characterization of cellulose extracted from the cocoa pod husk of *Theobroma cacao* L. **Industrial Crops and Products**, v. 226, p. 120579, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2025.120579>
- MILIÃO, G. L.; DE OLIVEIRA, A. P. H.; SOARES, L. D. S.; ARRUDA, T. R.; VIEIRA, É. N. R.; LEITE JUNIOR, B. R. D. C. Unconventional food plants: Nutritional aspects and perspectives for industrial applications. **Future Foods**, v. 5, p. 100124, 2022. Disponível em:

MIOSO, R.; TOLEDO MARANTE, F. J.; HERRERA BRAVO DE LAGUNA, I. *Penicillium roqueforti* : a multifunctional cell factory of high value-added molecules. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 781–791, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.12706>

MONTEIRO, G. P.; TAVARES, I. M. de C.; CARVALHO, M. C. F. de; CARVALHO, M. S.; PIMENTEL, A. B.; SANTOS, P. H.; BOAS, E. V. de B. V.; OLIVEIRA, J. R. de; CAPELOSSI, V. R.; BILAL, M.; FRANCO, M. Evaluation of fungal biomass developed from cocoa by-product as a substrate with corrosion inhibitor for carbon steel. **Chemical Engineering Communications**, v. 210, n. 7, p. 1207–1222, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00986445.2022.2073228>

MUGUDA, S.; WYNDHAM, M. Recycling biopolymer stabilised earthen construction materials using β -mannanase. **Construction and Building Materials**, v. 457, p. 139334, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2024.139334>

MURUGAN, P. C.; JOSEPH SEKHAR, S. Investigation on the yield of producer gas from tamarind shell (*Tamarindus Indica*) as feedstock in an Imbert type biomass gasifier. **Fuel**, v. 292, p. 120310, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.120310>

NABORA, C. S.; KINGONDU, C. K.; KIVEVELE, T. T. Tamarindus Indica fruit shell ash: a low cost and effective catalyst for biodiesel production from Parinari curatellifolia seeds oil. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 3, p. 253, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0256-3>

NEVES, I. C. O.; SILVA, S. H.; OLIVEIRA, N. L.; LAGO, A. M. T.; NG, N.; SULTANI, A.; CAMPELO, P. H.; VERÍSSIMO, L. A. A.; DE RESENDE, J. V.; ROGERS, M. A. Effect of carrier oil on α -tocopherol encapsulation in ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) mucilage-whey protein isolate microparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 105, p. 105716, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105716>

NORAPHAIPHIPAKSA, N.; SOCHU, W.; MANONUKUL, A.; KANCHANOMAI, C. Experimental and numerical investigations to determine the modulus and fracture mechanics of tamarind seed (*Tamarindus indica* L.). **Biosystems Engineering**, v. 151, p. 17–27, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2016.08.021>

OLIVEIRA MONTEIRO, L. M.; VICI, A. C.; MESSIAS, J. M.; HEINEN, P. R.; PINHEIRO, V. E.; VARGAS RECHIA, C. G.; BUCKERIDGE, M. S.; TEIXEIRA DE MORAES POLIZELI, M. D. L. Increased *Malbranchea pulchella* β -glucosidase production and its application in agroindustrial residue hydrolysis: A research based on experimental designs. **Biotechnology Reports**, v. 30, p. e00618, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00618>

OLIVEIRA, P. C. *et al.* COCOA SHELL FOR THE PRODUCTION OF ENDOGLUCANASE BY *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 IN SOLID STATE FERMENTATION AND BIOCHEMICAL PROPERTIES. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 18, n. 3, p. 777–787, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n3/Oliveira>

PANIAGUA-GARCÍA, A. I.; GARITA-CAMBRONERO, J.; GONZÁLEZ-ROJO, S.; DÍEZ-ANTOLÍNEZ, R. Optimization of lactic acid production from apple and tomato pomaces by thermotolerant bacteria. **Journal of Environmental Management**, v. 366, p. 121806, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.121806>

PATEL, K.; DUDHAGARA, P. Compatibility testing and enhancing the pulp bleaching process by

hydrolases of the newly isolated thermophilic *Isoptericola variabilis* strain UD-6. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 38, n. 2, p. 144–160, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10242422.2019.1711067>

PATEL, R.; RAJARAMAN, T. S.; RANA, P. H.; AMBEGAONKAR, N. J.; PATEL, S. A review on techno-economic analysis of lignocellulosic biorefinery producing biofuels and high-value products. **Results in Chemistry**, v. 13, p. 102052, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2025.102052>

PATTANAKITJAROENCHAI, S.; PITSAWONG, P.; KHAT-UDOMKIRI, N. Exploration of cosmetic bioactive compounds from cocoa bean shell using polyol-based microwave-assisted extraction: Cytotoxicity, anti-tyrosinase, and anti-melanogenesis properties. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, v. 10, p. 100454, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2025.100454>

PAZ, M.; CORREIA-SÁ, L.; BECKER, H.; LONGHINOTTI, E.; DOMINGUES, V. F.; DELERUE-MATOS, C. Validation of QuEChERS method for organochlorine pesticides analysis in tamarind (*Tamarindus indica*) products: Peel, fruit and commercial pulp. **Food Control**, v. 54, p. 374–382, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.005>

PERWEZ, M.; AL ASHEH, S. Valorization of agro-industrial waste through solid-state fermentation: Mini review. **Biotechnology Reports**, v. 45, p. e00873, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2024.e00873>

PHAM, T. A.; BERRIN, J. G.; RECORD, E.; TO, K. A.; SIGOILLOT, J.-C. Hydrolysis of softwood by *Aspergillus* mannanase: Role of a carbohydrate-binding module. **Journal of Biotechnology**, v. 148, n. 4, p. 163–170, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.05.012>

PIVA, S. F.; DE OLIVEIRA MEIRA, A. C. F.; DE MORAIS, L. C.; ALEXANDRE, A. C. S.; DE RESENDE, J. V. Mucilage of *Pereskia aculeata* Miller as Cryoprotectant of Frozen Strawberries: Preservation of Bioactive Compounds and Microstructure. **Journal of Food Process Engineering**, v. 48, n. 1, p. e70027, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfpe.70027>

PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE, L.; KLEY VALLADARES-DIESTRA, K.; AMARO BITTENCOURT, G.; FÁTIMA MURAWSKI DE MELLO, A.; SARMIENTO VÁSQUEZ, Z.; ZWIERCHECZEWSKI DE OLIVEIRA, P.; VINÍCIUS DE MELO PEREIRA, G.; RICARDO SOCCOL, C. Added-value biomolecules' production from cocoa pod husks: A review. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126252, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126252>

PRADO, E. R. L.; RIAL, R. C. Advances in conversion technologies for biofuels from wheat and corn straws. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 63, p. 103481, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103481>

PRAJAPATI, B. P.; JANA, U. K.; SURYAWANSHI, R. K.; KANGO, N. Sugarcane bagasse saccharification using *Aspergillus tubingensis* enzymatic cocktail for 2G bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 152, p. 653–663, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.01.063>

PUMA VEGA, C. F.; KEMMELMEIER, K.; RUFINI, M.; SOARES DE CARVALHO, T.; DE SOUZA MOREIRA, F. M. Ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) Nutrition as Related to Soil Chemical and Physical Attributes and Plant Growth-Promoting Microorganisms. **Journal of Soil**

Science and Plant Nutrition, v. 20, n. 4, p. 1637–1654, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00235-9>

QIAN, S.; LU, M.; WANG, M.; ZHONG, C.; LV, L.; DIAO, E.; XIE, P.; JIN, C. Green utilization of sorghum straw by coupled hydrothermal pretreatment and cellulase hydrolysis for bacillomycin D production under fed-batch mode. **Process Biochemistry**, v. 146, p. 377–386, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.09.014>

RAJA, K. S.; MALIHA, A.; PAUL, S.; SHAKUR, M. S.; BARI, A. B. M. M. Unraveling the Obstacles to Transform Agro-Wastes into Value-Added Bioproducts: Implications for Sustainability. **Sustainable Operations and Computers**, p. S2666412725000091, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.susoc.2025.05.002>

RASTOGI, S.; SONI, R.; KAUR, J.; SONI, S. K. Unravelling the capability of *Pyrenophora phaeocomes* S-1 for the production of ligno-hemicellulolytic enzyme cocktail and simultaneous bio-delignification of rice straw for enhanced enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 458–469, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.012>

REICHE, A.-M.; TRETOLA, M.; EGGERSCHWILER, L.; PINOTTI, L.; DOHME-MEIER, F. Former food and cocoa bean shells in early-lactating cows on a herbage-based diet: effects on ruminal fermentation and blood metabolites. **animal**, v. 19, n. 4, p. 101477, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.animal.2025.101477>

REIS, N. D. S.; LESSA, O. A.; PACHECO, C. S. V.; PEREIRA, N. E.; SOARES, G. A.; SILVA, E. G. P.; OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Cocoa shell as a substrate for obtaining endoglucanase and xylanase from *Aspergillus oryzae* ATCC 10124. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 42, p. e48211, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v42i1.48211>

RIBEIRO, T. A. *et al.* Unlocking xylan's potential: Coffee husk-derived xylanolytic blend for sustainable bioprocessing. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 15, n. 6, p. 8203–8219, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-024-06150-8>

ROY CHOUDHURY, S.; DAS, A.; CHAKRABORTY, R. Review on progress in cellulase catalyzed saccharification of agricultural lignocellulosic biomass towards fermentable sugar and bioethanol: Kinetics & reactor configurations. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 58, p. 103142, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103142>

SAHU, S.; BANSAL, U.; SINGH, G.; ARYA, S. K. Comparison of physical, chemical, physico-chemical, and enzymatic pretreatment of paddy straw for ethanol production. **Sustainable Chemistry for the Environment**, v. 10, p. 100239, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scenv.2025.100239>

SALCEDO-PUERTO, O.; MENDOZA-MARTINEZ, C.; VAKKILAINEN, E. Solid residues from cocoa production chain: Assessment of thermochemical valorization routes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 208, p. 115048, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2024.115048>

SALES DE MENEZES, L. H.; CARNEIRO, L. L.; MARIA DE CARVALHO TAVARES, I.; SANTOS, P. H.; PEREIRA DAS CHAGAS, T.; MENDES, A. A.; PARANHOS DA SILVA, E. G.; FRANCO, M.; RANGEL DE OLIVEIRA, J. Artificial neural network hybridized with a genetic algorithm for optimization of lipase production from *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid-state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 31, p. 101885, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101885>

- SAMOMSSA, I.; DOMGA, R.; PAHIMI, H.; LEMOUGNA, P. N.; SAMITNA, A. A.; CHINJE, U. The effect of corn cob, cotton shell and rice straw mixture during carbonization on charcoal yield using mixture design. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 101, n. 12, p. 101498, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jics.2024.101498>
- SÁNCHEZ, M.; LACA, A.; LACA, A.; DÍAZ, M. Cocoa Bean Shell: A By-Product with High Potential for Nutritional and Biotechnological Applications. **Antioxidants**, v. 12, n. 5, p. 1028, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox12051028>
- SÁNCHEZ, M.; PENÍN, E.; LACA, A.; LACA, A.; DÍAZ, M. Cocoa bean shell hydrolysates to be used as a basis for formulating a new functional beverage. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 62, p. 103447, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103447>
- SANTOS DA SILVA QUINTO, A. *et al.* Valorization of agri-food by-products for laccase oxidative multienzyme extract production and dye degradation: A sustainable biodegradation approach. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 102, n. 6, p. 101717, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jics.2025.101717>
- SANTOS, F. H.; DE CARVALHO OLIVEIRA, L.; BAKALIS, S.; CRISTIANINI, M. Techno-functional properties and in vitro digestibility of ora-pro-nóbis flour and protein concentrate for assessing food application potential. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 18, n. 8, p. 6793–6802, 2024 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11694-024-02692-7>
- SANTOS, I. A. *et al.* Cocoa Bean Shell Wastes for the Green Synthesis of Silver Nanoparticles with Antimicrobial Activity Against Foodborne Pathogens. **Food and Bioprocess Technology**, v. 17, n. 9, p. 2842–2854, 2024 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03299-4>
- SANTOS, I. A. *et al.* Enhanced physicochemical and antifungal properties of starch bionanocomposites reinforced with nanocellulose and functionalized with AgNPs derived from cocoa bean shell. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 294, p. 139262, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.139262>
- SHAN, J.; CHEN, Y.; LIANG, C.; CHEN, T.; ZHANG, X.; LIU, Q.; CHEN, S.; SUN, W.; CHEN, Y. Production of lactic acid from corn straw: One step and two step pre-treatment strategies and bioconversion efficiency evaluation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 13, n. 3, p. 117097, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.117097>
- SHARMA, D.; SHARMA, V.; TSAI, M.-L.; YADAV, A.; NARGOTRA, P.; SUN, P.-P.; CHEN, C.-W.; DONG, C.-D. Improved xylooligosaccharides production from xylan extracted using ultrasound-assisted alcoholic deep eutectic solvent pretreatment of pineapple leaf waste. **Industrial Crops and Products**, v. 224, p. 120250, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120250>
- SHEN, Y.; MA, N.; LIU, S.; XU, G.; ZHANG, J. Mycotoxins and secondary metabolites from fruit postharvest pathogenic *Penicillium* species. **Food Chemistry**, v. 488, p. 144880, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144880>
- SHUKOR, H.; ABDESHAHIAN, P.; AL-SHORGANI, N. K. N.; HAMID, A. A.; RAHMAN, N. A.; KALIL, M. S. Enhanced mannan-derived fermentable sugars of palm kernel cake by mannanase-catalyzed hydrolysis for production of biobutanol. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 257–264, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.084>
- SILVA, D. L. G.; GIROTTO, L. M.; SOUZA, S. B. D. S. D.; PORCIUNCULA, B. D. A.;

BARROS, B. C. B. Evaluation of hot-air drying conditions of ora-pro-nobis leaves: Effects on bioactive compounds and powder properties. **Food and Humanity**, v. 3, p. 100359, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2024.100359>

SILVA, K. C. G.; AMARAL, T. N.; JUNQUEIRA, L. A.; DE OLIVEIRA LEITE, N.; DE RESENDE, J. V. Adsorption of protein on activated carbon used in the filtration of mucilage derived from *Pereskia aculeata* Miller. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 23, p. 42–49, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2017.01.003>

SILVA, L. D. S.; PACHECO, F. C.; OLIVEIRA, T. O. D.; MARTINS, E. M. F.; MARTINS, M. L.; CASTRO, W. D. F.; FELISBERTO, M. H. F.; LEITE JÚNIOR, B. R. D. C. Sustainable Integration of Ora-Pro-Nobis (*Pereskia aculeata* Miller) in Gluten-Free and Lactose-Free Sweet Bread: Impacts on Quality and Functional Properties. **Sustainability**, v. 17, n. 3, p. 1338, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su17031338>

SILVA, S. H.; NEVES, I. C. O.; MEIRA, A. C. F. D. O.; ALEXANDRE, A. C. S.; OLIVEIRA, N. L.; RESENDE, J. V. D. Freeze-dried Petit Suisse cheese produced with ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) biopolymer and carrageenan mix. **LWT**, v. 149, p. 111764, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111764>

SIVASANKAR, V.; RAJKUMAR, S.; MURUGESH, S.; DARCHEN, A. Tamarind (*Tamarindus indica*) fruit shell carbon: A calcium-rich promising adsorbent for fluoride removal from groundwater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 225–226, p. 164–172, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.015>

SOARES, T. F.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Cocoa By-Products: Characterization of Bioactive Compounds and Beneficial Health Effects. **Molecules**, v. 27, n. 5, p. 1625, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27051625>

SOFIAVIZHIMALAR, A.; SUNITHAJASMINE, B.; RAJALAKSHMI, B. S.; THAMARAISELVI, C.; SUMATHIJONES, C.; PANDEY, S.; ALFARHAN, A.; MUTHUSAMY, K.; CHANG, S. W.; RAVINDRAN, B. Utilization of natural polysaccharide from *Tamarindus indica* L. seeds for the effective reduction of pollutants in cheese processed wastewater. **Chemosphere**, v. 305, p. 135241, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135241>

SONI, H.; GANAIE, Mohd. A.; PRANAW, K.; KANGO, N. Design-of-experiment strategy for the production of mannanase biocatalysts using plam karnel cake and its application to degrade locust bean and guar gum. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 229–234, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.01.001>

SOUZA, L. O. *et al.* Procurement and Characterization of Biodegradable Films made from Blends of Eucalyptus, Pine and Cocoa Bean Shell Nanocelluloses. **Waste and Biomass Valorization**, v. 14, n. 10, p. 3169–3181, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01762-5>

SOUZA, L. O.; DE BRITO, A. R.; BONOMO, R. C. F.; SANTANA, N. B.; ALMEIDA ANTUNES FERRAZ, J. L. D.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; ARAÚJO FERNANDES, A. G. D.; FERREIRA, M. L. O.; DE OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Comparison of the biochemical properties between the xylanases of *Thermomyces lanuginosus* (Sigma®) and excreted by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 during the solid state fermentation of sugarcane bagasse. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 277–284, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.08.016>

- SOUZA, F. N. S.; VIEIRA, S. R.; CAMPIDELLI, M. L. L.; ROCHA, R. A. R.; RODRIGUES, L. M. A.; SANTOS, P. H.; CARNEIRO, J. D. S.; TAVARES, I. M. C.; OLIVEIRA, C. P. Impact of using cocoa bean shell powder as a substitute for wheat flour on some of chocolate cake properties. **Food Chemistry**, v. 381, p. 132215, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132215>
- SRIVASTAVA, P. K.; KAPOOR, M. Production, properties, and applications of endo- β -mannanases. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 1, p. 1–19, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.001>
- SUNAR, S. L.; KUMARA, M. K.; ORUGANTI, R. K.; KHADKA, K. K.; PANDA, T. K.; BHATTACHARYYA, D. Pretreatment and anaerobic co-digestion of lignocellulosic biomass: Recent developments. **Bioresource Technology Reports**, v. 30, p. 102133, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2025.102133>
- SVIECH, F.; CORZO, I. J. M.; D'ÁVILA, M. A.; ANDREOLA, K.; PRATA, A. S. Ora-pro-nobis mucilage as a structuring ingredient in 3D printing formulations. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 38, p. 101068, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2024.101068>
- TAVARES, I. M. D. C.; SANTOS, R. R. C. D.; COSTA, F. S.; JESUS, G. L. S. D.; SANCHES, A.; SILVA, F. N.; IRFAN, M.; OLIVEIRA, R. A. D.; FRANCO, M. Improving the extraction yield of essential oil from *Pimenta dioica* (L.) Merr. using *Aspergillus niger* ATCC 1004 enzyme blend. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, p. bab.2658, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bab.2658>
- THIRUMAL, V.; DHAMODHARAN, K.; YUVAKKUMAR, R.; RAVI, G.; SARAVANAKUMAR, B.; THAMBIDURAI, M.; DANG, C.; VELAUTHAPILLAI, D. Cleaner production of tamarind fruit shell into bio-mass derived porous 3D-activated carbon nanosheets by CVD technique for supercapacitor applications. **Chemosphere**, v. 282, p. 131033, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131033>
- TIAN, S.; DUAN, A.; LI, P.; ZHOU, Z.; HUANG, Q.; CHEN, Y.; ZHU, Q.; ZHU, Y. Phytochemical profile of *Pereskia aculeata* Miller and its bioactive constituents for treating rheumatoid arthritis' s inflammation via inhibiting COX-2 target. **Journal of Functional Foods**, v. 127, p. 106771, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2025.106771>
- TORRES, T. M. S.; ÁLVAREZ-RIVERA, G.; MAZZUTTI, S.; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, J. D.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E.; FERREIRA, S. R. S. Neuroprotective potential of extracts from leaves of ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata*) recovered by clean compressed fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 179, p. 105390, 2022 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2021.105390>
- TORRES, T. M. S.; MAZZUTTI, S.; CASTIANI, M. A.; SIDDIQUE, I.; VITALI, L.; FERREIRA, S. R. S. Phenolic compounds recovered from ora-pro-nobis leaves by microwave assisted extraction. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 39, p. 102238, 2022 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102238>
- TRENTIN, M.; BAMPI, M.; DINON, A. Z. Caracterização físico química e tecnológica de bolos adicionados de farinha de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller). **Scientia Plena**, v. 20, n. 12, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2024.121503>. Acesso em: 27 jun. 2025.
- USMAN, S.; ZHANG, Y.; YANG, X.; GUO, X.; SHEN, Y. Lignocellulose degradation, enzymatic

saccharification and bioethanol production from whole-crop sweet sorghum silage inoculated with feruloyl-esterase producing lactic acid bacteria. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 311, p. 143691, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.143691>

VAN ZYL, W. H.; ROSE, S. H.; TROLLOPE, K.; GÖRGENS, J. F. Fungal β -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1203–1213, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.05.011>

VÁSQUEZ, Z. S.; DE CARVALHO NETO, D. P.; PEREIRA, G. V. M.; VANDENBERGHE, L. P. S.; DE OLIVEIRA, P. Z.; TIBURCIO, P. B.; ROGEZ, H. L. G.; GÓES NETO, A.; SOCCOL, C. R. Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. **Waste Management**, v. 90, p. 72–83, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.04.030>

VELJKOVIĆ, V. B.; BIBERDŽIĆ, M. O.; BANKOVIĆ-ILIĆ, I. B.; DJALOVIĆ, I. G.; TASIĆ, M. B.; NJEŽIĆ, Z. B.; STAMENKOVIĆ, O. S. Biodiesel production from corn oil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 91, p. 531–548, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.024>

VIEIRA, C. R.; GRANCIERI, M.; MARTINO, H. S. D.; CÉSAR, D. E.; BARRA, R. R. S. A beverage containing ora-pro-nobis flour improves intestinal health, weight, and body composition: A double-blind randomized prospective study. **Nutrition**, v. 78, p. 110869, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110869>

VIEIRA, C. R.; SILVA, B. P.; CARMO, M. A. V.; AZEVEDO, L.; NOGUEIRA, D. A.; DUARTE MARTINO, H. S.; SILVA, R. R. Effect of *Pereskia aculeata* Mill. *in vitro* and in overweight humans: A randomized controlled trial. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfbc.12903>. Acesso em: 27 jun. 2025.

VINUTHANA, V. H.; GOVINDARAJ, O.; SUBRAMANIAM, S.; GNANACHITRA, M.; UTHANDI, S. Harnessing lignocellulosic biomass: Insights into pre-treatment strategies and hydrolytic enzyme production. **Industrial Crops and Products**, v. 229, p. 120986, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2025.120986>

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; HONG, S.-B.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R. A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, n. 1, p. 343–371, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>

WANG, J.; HUANG, Z.; JIANG, Q.; ROUBÍK, H.; XU, Q.; GHARSALLAOUI, A.; CAI, M.; YANG, K.; SUN, P. Fungal solid-state fermentation of crops and their by-products to obtain protein resources: The next frontier of food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 138, p. 628–644, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.06.020>

WANG, N.; LI, Y.; SUN, D.; MIAO, M.; JIANG, Z. A novel β -mannanase from *Stachybotrys chlorohalonata* for production of fenugreek manno-oligosaccharides. **Food Bioscience**, v. 63, p. 105539, 2025 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105539>

WANG, S. *et al.* Efficient conversion of corn straw to feed protein through solid-state fermentation using a thermophilic microbial consortium. **Waste Management**, v. 194, p. 298–308, 2025 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2025.01.023>

- WU, J.; WANG, C.; LIU, F.; SUN, X.; LI, Y.; WU, P.; ZHANG, J. Optimization of pretreatment and fermentation processes to enhance the production of succinic acid from corn straw by *Actinobacillus succinogenes*. **Industrial Crops and Products**, v. 222, p. 119673, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119673>
- XU, C. *et al.* Biological saccharification coupled with anaerobic digestion using corn straw for sustainable methane production. **Bioresource Technology**, v. 367, p. 128277, 2023 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128277>
- XU, C.; TONG, S.; SUN, L.; GU, X. Cellulase immobilization to enhance enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: An all-inclusive review. **Carbohydrate Polymers**, v. 321, p. 121319, 2023 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121319>
- YAFETTO, L. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. **Heliyon**, v. 8, n. 3, p. e09173, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173>
- YOU, J.; LIU, J.-F.; YANG, S.-Z.; MU, B.-Z. Low-temperature-active and salt-tolerant β -mannanase from a newly isolated *Enterobacter* sp. strain N18. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 2, p. 140–146, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.06.001>
- YOUNES, A.; KARBOUNE, S. Enzymatic generation of cocoa bean shells oligosaccharides and feruloylated oligo/polysaccharides. **Food Bioscience**, v. 56, p. 103296, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103296>
- YU, M. *et al.* Metabolizable energy and amino acid-deficient diets supplemented with β -mannanase in response to growth performance, intestinal health, and immune response in broilers. **Poultry Science**, v. 104, n. 7, p. 105222, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2025.105222>
- YU, X.; LI, J.; SUN, Y.; XIE, Y.; SU, Y.; TANG, S.; BIAN, S.; LIU, L.; HUO, F.; HUANG, Q.; CHEN, G. Co-immobilized multi-enzyme biocatalytic system on reversible and soluble carrier for saccharification of corn straw cellulose. **Bioresource Technology**, v. 395, p. 130325, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130325>
- ZHANG, C.; LIANG, T.; LI, C.; JI, H.; LIU, H.; LING, Z.; TIAN, Z. Caproate production from the mixture of corn straw and food waste via chain elongation with reinforcement of biofilm. **Process Biochemistry**, v. 147, p. 137–146, 2024 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.08.019>
- ZHANG, R.; MA, S.; LI, L.; ZHANG, M.; TIAN, S.; WANG, D.; LIU, K.; LIU, H.; ZHU, W.; WANG, X. Comprehensive utilization of corn starch processing by-products: A review. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 4, n. 3, p. 89–107, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2021.08.003>
- ZHANG, X.; FANG, C.; CHENG, Y.; LI, M.; LIU, J. Fine extraction of cellulose from corn straw and the application for eco-friendly packaging films enhanced with polyvinyl alcohol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 268, p. 131984, 2024 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131984>
- ZHAO, D.; ZHANG, X.; WANG, Y.; NA, J.; PING, W.; GE, J. Purification, biochemical and secondary structural characterisation of β -mannanase from *Lactobacillus casei* HDS-01 and juice clarification potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, p. 826–834,

2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.157>

ZHU, L.; TANG, W.; MA, C.; HE, Y.-C. Efficient co-production of reducing sugars and xylooligosaccharides via clean hydrothermal pretreatment of rape straw. **Bioresource Technology**, v. 388, p. 129727, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129727>

ZOU, L.; QI, Z.; CHENG, H.; YU, B.; LI, Y.-Y.; LIU, J. Advanced anaerobic digestion of household food waste pretreated by in situ-produced mixed enzymes via solid-state fermentation: Feasibility and application perspectives. **Environmental Research**, v. 252, p. 119137, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.119137>

ABOU-ELSOUD, M.; KHODER, R. M.; SALAMA, M.; WANG, S.; KHALIFA, I.; CAI, Z.; AHN, D. U.; HUANG, X. Novel pectin-low-density lipoprotein oleogels as techno-functional ingredients improved the structural and textural characteristics of gluten-free bread. **Food Chemistry**, v. 509, p. 148617, 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2026.148617>

ALIZADEH-BAHAABADI, G.; LAKZADEH, L.; FOROOTANFAR, H.; AKHAVAN, H.-R. Optimization of gluten-free bread production with low aflatoxin level based on quinoa flour containing xanthan gum and laccase enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 200, p. 61–76, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.091>

ALVES, L. A. A. D. S.; LORENZO, J. M.; GONÇALVES, C. A. A.; SANTOS, B. A. D.; HECK, R. T.; CICHOSKI, A. J.; CAMPAGNOL, P. C. B. Production of healthier bologna type sausages using pork skin and green banana flour as a fat replacers. **Meat Science**, v. 121, p. 73–78, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.06.001>

AMINI KHOOZANI, A.; KEBEDE, B.; EL-DIN AHMED BEKHIT, A. Rheological, textural and structural changes in dough and bread partially substituted with whole green banana flour. **LWT**, v. 126, p. 109252, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109252>

AYALA-SOTO, F. E.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; WELTI-CHANES, J. Effect of arabinoxylans and laccase on batter rheology and quality of yeast-leavened gluten-free breads. **Journal of Cereal Science**, v. 73, p. 10–17, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.11.003>

AZIZI, S.; AZIZI, M. H.; MOOGOUEI, R.; RAJAEI, P. The effect of Quinoa flour and enzymes on the quality of gluten-free bread. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 5, p. 2373–2382, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/fsn3.1527>

BANU, I.; APRODU, I. Investigations on Functional and Thermo-Mechanical Properties of Gluten Free Cereal and Pseudocereal Flours. **Foods**, v. 11, n. 13, p. 1857, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods11131857>

BASTOS, S. C.; PIMENTA, M. E. S. G.; PIMENTA, C. J.; REIS, T. A.; NUNES, C. A.; PINHEIRO, A. C. M.; FABRÍCIO, L. F. F.; LEAL, R. S. Alternative fat substitutes for beef burger: technological and sensory characteristics. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 2046–2053, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1233-2>

- BATISTA, A. L. D. *et al.* Developing a synbiotic fermented milk using probiotic bacteria and organic green banana flour. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 242–250, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.037>
- BEN HMAD, I.; MOKNI GHRIBI, A.; BOUASSIDA, M.; AYADI, W.; BESBES, S.; ELLOUZ CHAABOUNI, S.; GARGOURI, A. Combined effects of α -amylase, xylanase, and cellulase coproduced by *Stachybotrys microspora* on dough properties and bread quality as a bread improver. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 277, p. 134391, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134391>
- BENDER, D.; SCHÖNLECHNER, R. Innovative approaches towards improved gluten-free bread properties. **Journal of Cereal Science**, v. 91, p. 102904, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102904>
- BOUREKOUA, H.; FERRADJI, S.; AYAD, R.; CHIKHOUNE, A.; BELMOULOU, R.; DJEGHIM, F.; WÓJTOWICZ, A.; RÓŻYŁO, R. Enhancing gluten-free bread-making: process optimization of starch blend in premix with rice and corn flour enriched with various natural flours. **Cereal Research Communications**, v. 53, n. 4, p. 2457–2476, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42976-025-00655-2>
- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC no263, DE 22 DE SETEMBRO DE 2005. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**, [S. l.: s. n]. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0263_22_09_2005.html
- BURBANO, J. J.; ROJAS, M.; FERNÁNDEZ BRAVO, M.; VIDAURRE-RUIZ, J.; REPO CARRASCO VALENCIA, R.; CORREA, M. J. Pumpkin seed flour (a cold-pressed by-product): characterization and rheological assessment in gluten-free bread premixes. **Sustainable Food Technology**, v. 3, n. 6, p. 2041–2051, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D5FB00268K>
- CANTERO-RUIZ DE EGUINO, L.; SALMERÓN, J.; OJEDA, M.; PEREZ-ELORTONDO, F. J.; ETAIO, I.; SIMÓN, E.; MIRANDA, J.; MARTINEZ, O. Key quality dimensions for gluten-free bread perceived by general and non-gluten consumers: A case study with apple pomace and flaxseed. **Future Foods**, v. 12, p. 100696, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2025.100696>
- CARLIER, S.; DAHDOUH, L.; RICCI, J.; GROSMIRE, L. Utilising starchy tropical agri-resources through gluten-free bread-making: the case of cassava, green banana and sweet potato flours. **LWT**, v. 234, p. 118595, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.118595>
- CHEL-GUERRERO, L.; SALAZAR-VEGA, I. M.; REJÓN-CORAL, J.; CASTELLANOS-RUELAS, A.; BETANCUR-ANCONA, D. Techno-functional properties of unripe *Musa balbisiana* ABB flour for partial substitution of wheat flour in cookies and doughnuts. **Food and Humanity**, v. 6, p. 101107, 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2026.101107>
- CHEN, Y.; FU, Q.; LI, Z.; SHEN, W.; LI, J.; PENG, D.; JIN, W. Nanocellulose improves the texture profiles of gluten-free bread through filler reinforcement and gas cell stabilization. **Food Hydrocolloids**, v. 173, p. 112266, 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2025.112266>

CHOCKCHASAWASDEE, S.; MENDOZA, M. C.; BEECROFT, C. A.; KERR, A. C.; STATHOPOULOS, C. E.; FIORE, A. Development of a gluten free bread enriched with faba bean husk as a fibre supplement. **LWT**, v. 173, p. 114362, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114362>

DAHIYA, S.; BAJAJ, B. K.; KUMAR, A.; TIWARI, S. K.; SINGH, B. A review on biotechnological potential of multifarious enzymes in bread making. **Process Biochemistry**, v. 99, p. 290–306, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.09.002>

DAS, M.; RAJAN, N.; BISWAS, P.; BANERJEE, R. A novel approach for resistant starch production from green banana flour using amylopullulanase. **LWT**, v. 153, p. 112391, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112391>

DE AGUIAR, E. V.; CENTENO, A. C. L. S.; GARCIA DOS SANTOS, F.; CAPRILES, V. D. Whole grain pearl millet-based gluten-free bread: A novel alternative with nutrition and sensory appeal. **Applied Food Research**, v. 4, n. 2, p. 100520, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.afres.2024.100520>

DE AGUIAR, E. V.; COSTA, B. G.; DOS SANTOS, F. G.; GONÇALVES, E. M. R.; QUEIROZ, V. A. V.; CAPRILES, V. D. Sorghum-based gluten-free bread quality optimization – A mixture design approach. **Future Foods**, v. 13, p. 100958, 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2026.100958>

DELIKANLI-KIYAK, B.; OZCAN, T. Harnessing algae for gluten-free food innovation: Nutritional, functional and sustainability perspectives. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 149, p. 108768, 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2025.108768>

DJEUKEU, W. A.; ASSIENE, J. A. A.; DONGHO, F. F. D.; BOUDJEKA, V. G.; DEMASSE, A. M.; NYANGONO, F. C. B.; FONGZOSSIE, E. F.; GOUADO, I. Improving gluten-free bread volume using additives: A review. **Food Chemistry Advances**, v. 5, p. 100738, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100738>

DOGRUER, I.; BASER, F.; GULEC, S.; TOKATLI, F.; OZEN, B. Formulation of Gluten-Free Cookies Utilizing Chickpea, Carob, and Hazelnut Flours through Mixture Design. **Foods**, v. 12, n. 19, p. 3689, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods12193689>

DOYLE, J. B.; SILVESTER, J.; LUDVIGSSON, J. F.; LEBWOHL, B. Advances in the pathophysiology, diagnosis, and management of celiac disease. **BMJ**, v. 391, p. e081353, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmj-2024-081353>

FAN, T.; MA, C.; XU, Y.; AI, L.; ZHANG, G.; WANG, B.; XU, X.; LIU, Y.; YANG, Y.; ZHANG, N. Effects of pea protein, chickpea protein and zein on the processing characteristics of gluten-free rice dough and the quality characteristics of its bread. **Food Hydrocolloids**, v. 173, p. 112263, 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2025.112263>

FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations. Production quantities of Bananas by country. FAOSTAT: Crops and livestock products. Rome, 2024b. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acesso em: 12 mar. 2026.

- FEITOSA, B. F.; ALCÂNTARA, C. M. D.; LUCENA, Y. J. A. D.; OLIVEIRA, E. N. A. D.; CAVALCANTI, M. T.; MARIUTTI, L. R. B.; LOPES, M. F. Green banana biomass (*Musa* spp.) as a natural food additive in artisanal tomato sauce. **Food Research International**, v. 170, p. 113021, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113021>
- FRATELLI, C.; SANTOS, F. G.; MUNIZ, D. G.; HABU, S.; BRAGA, A. R. C.; CAPRILES, V. D. Psyllium Improves the Quality and Shelf Life of Gluten-Free Bread. **Foods**, v. 10, n. 5, p. 954, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods10050954>
- FREITAS, M. A.; FERREIRA, J.; NUNES, M. C.; RAYMUNDO, A. The chemistry and bioactive properties behind microalgae-enriched gluten-free breads. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 59, n. 2, p. 872–885, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ijfs.16846>
- GONZÁLEZ, L. C.; ÁLVAREZ BARRETO, C. I.; TOLABA, M. P. Effect of different hydrocolloids on the quality and aging of gluten-free bread based on pre-hydrated rice grains. **Food Bioscience**, v. 69, p. 106857, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.106857>
- GUADALUPE-MOYANO, V.; PALACIOS-PONCE, A. S.; ROSELL, C. M.; CORNEJO, F. Impact of drying methods on banana flour in the gluten-free bread quality. **LWT**, v. 168, p. 113904, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113904>
- Grand View Research. (2026). Gluten-free Products Market, Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Bakery Products, Dairy/ Dairy Alternatives), By Distribution Channel (Specialty Stores, Online), By Region, And Segment Forecasts, 2026 – 2033. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/gluten-free-products-market>.
- HAGER, A.-S.; ARENDT, E. K. Influence of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), xanthan gum and their combination on loaf specific volume, crumb hardness and crumb grain characteristics of gluten-free breads based on rice, maize, teff and buckwheat. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 1, p. 195–203, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.12.021>
- HAMDANI, A. M.; WANI, I. A.; BHAT, N. A.; MAQBOOL, K.; MIR, S. A. Effect of apricot, guar and locust bean gum hydrocolloids on pasting, antioxidant, rheology, thermal and sensory properties of gluten-free breads. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 31, p. 100397, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2023.100397>
- HE, N.; HE, M.; XIAO, Z.; LI, L.; ZHANG, X.; ZHANG, G.; XIAO, J.; LI, B. Zein and DATEM synergistically improve quinoa-based gluten-free bread: Processing, quality, and nutritional insights. **LWT**, v. 234, p. 118556, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.118556>
- HERNÁNDEZ-AGUIRRE, M. A.; ISLAS-HERNÁNDEZ, J. J.; SÁNCHEZ-PARDO, M. E.; RODRÍGUEZ-AMBRIZ, S. L.; OSORIO-DÍAZ, P. Response surface methodology for optimization of gluten-free bread made with unripe banana flour. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 13, n. 3, p. 1652–1660, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00082-y>
- HUANG, Q.; LIU, C.; GAO, S.; SUN, Y.; ZHANG, X.; YANG, L. Effects of green and ripe banana flours on cookie characteristics: A comprehensive study from frozen dough to cookies. **LWT**, v. 241, p. 119101, 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2026.119101>

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção de banana. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2024. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/banana/br>. Acesso em: 12 mar. 2026.

IRONDI, E. A.; IMAM, Y. T.; AJANI, E. O.; ALAMU, E. O. Natural and modified food hydrocolloids as gluten replacement in baked foods: Functional benefits. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 6, n. 4, p. 163–171, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2023.10.001>

ISLAM, S.; ISLAM, Md. F.; BHUIYAN, M. N. I.; TISA, K. J.; KIBRIA, A.; BHUIYAN, Md. H. R.; ABEDIN, Md. J.; ABDULLAH, A. T. M.; KABIR, Md. A.; MIAH, Md. A. S. Integrating green banana and cauliflower into whole wheat pasta: Approaches to enhance nutritional benefits while maintaining quality. **Food Chemistry Advances**, v. 6, p. 100933, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.focha.2025.100933>

JIANG, R.; LIN, Z.; SHI, H.; WANG, Y.; WANG, Y.; YANG, Q. Chickpea sourdough as a functional ingredient in gluten-free bread: Impact on quality attributes. **Food Hydrocolloids**, v. 172, p. 112007, 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2025.112007>

KOH, J. E. W.; HAGIWARA, Y.; OH, S. L.; TAN, J. H.; CIACCIO, E. J.; GREEN, P. H.; LEWIS, S. K.; RAJENDRA ACHARYA, U. Automated diagnosis of celiac disease using DWT and nonlinear features with video capsule endoscopy images. **Future Generation Computer Systems**, v. 90, p. 86–93, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.future.2018.07.044>

KUMAR, P. S.; SARAVANAN, A.; SHEEBA, N.; UMA, S. Structural, functional characterization and physicochemical properties of green banana flour from dessert and plantain bananas (*Musa* spp.). **LWT**, v. 116, p. 108524, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108524>

LIU, L.; YANG, H.; ZHANG, Q.; CHEN, X.; WANG, Y.; SHEN, Q.; DING, W. Gluten composition, modification, and applications in gluten-free food: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 346, p. 150625, 2026 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2026.150625>

LIU, Y. *et al.* Enhancing rheological properties of gluten-free batter and qualities of bread using locust bean gum and its β -mannanase hydrolysates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 350, p. 151003, 2026 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2026.151003>

MA, Y.; JIN, Y.; XIAO, Y.; YANG, P.; CHELLIAH, R.; SHAN, L.; OH, D.-H. A comprehensive review of gluten-free foods: Addressing quality defects and exploring novel enrichment strategies. **Food Hydrocolloids**, v. 173, p. 112261, 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2025.112261>

MADADI, M.; ROSHANAK, S.; SHAHIDI, F.; VARIDI, M. J. Optimization of a gluten-free sponge cake formulation based on quinoa, oleaster, and pumpkin flour using mixture design methodology. **Food Science & Nutrition**, v. 12, n. 4, p. 2973–2984, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/fsn3.3977>

- MAGALHÃES, A. E. R.; GASPARETTO, B. D. R.; NEVES, M. I. L.; STEEL, C. J.; CUNHA, R. L. Technological Aspects of the Bakery Industry Affecting Gluten Structure, Digestibility, and Immunogenicity. **ACS Food Science & Technology**, v. 5, n. 4, p. 1222–1238, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.4c01007>
- MENSAH, P. O.; OSEI TUTU, C.; AKONOR, P. T.; OWUSU-BEMPAH, J.; ASIEDU, B. K.; ADUSEI, H. O.; SAALIA, F. K. Development and evaluation of gluten-free rice bread formulated with hydrocolloid-protein additive systems. **Food and Humanity**, v. 6, p. 100956, 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2025.100956>
- MERCÊS, Z. D. C. D.; SALVADORI, N. M.; EVANGELISTA, S. M.; COCHLAR, T. B.; MEDEIROS, C. D. S.; LIMA, R. G. H.; BANDEIRA, A. S.; SOUZA, A. K. F. D.; DE OLIVEIRA RIOS, A.; OLIVEIRA, V. R. D. Sensory evaluation of plant-based burgers using green banana biomass, chickpea and teff: An approach with vegetarian and non-vegetarian assessors. **Food and Humanity**, v. 5, p. 100776, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2025.100776>
- MESTA-CORRAL, M.; GÓMEZ-GARCÍA, R.; BALAGURUSAMY, N.; TORRES-LEÓN, C.; HERNÁNDEZ-ALMANZA, A. Y. Technological and Nutritional Aspects of Bread Production: An Overview of Current Status and Future Challenges. **Foods**, v. 13, n. 13, p. 2062, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods13132062>
- MONTES, L.; SANTAMARIA, M.; GARZON, R.; ROSELL, C. M.; MOREIRA, R. Effect of polyphenols from *Ascophyllum nodosum* seaweeds on the rheology and digestion of corn starch gels and gluten-free bread features. **Heliyon**, v. 10, n. 7, p. e27469, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e27469>
- PEÑALVER, R.; NIETO, G. Developing a functional gluten-free sourdough bread by incorporating quinoa, amaranth, rice and spirulina. **LWT**, v. 201, p. 116162, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116162>
- PÉREZ-RODRÍGUEZ, E.; GARZÓN-LLORÍA, R.; PÉREZ-CARRILLO, E.; MOLINA-ROSELL, C.; IBARRA-HERRERA, C. C. Effect of solid-stated fermented grasshopper (*S. purpurascens*) on gluten-free bread: a nutritional, textural and rheological approach. **LWT**, v. 230, p. 118298, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.118298>
- PILUK, P.; KHEMTHONG, C.; CHUPEERACH, C.; SUTTISANSANEE, U.; CHAMCHAN, R.; THANGSIRI, S.; ON-NOM, N. Development and characterization of high protein and fiber gluten free bread formulations from egg white powder and resistant starch. **LWT**, v. 227, p. 117984, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.117984>
- PIRSA, S.; HAFEZI, K. Hydrocolloids: Structure, preparation method, and application in food industry. **Food Chemistry**, v. 399, p. 133967, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133967>
- PISTORIO, E.; GALLINA, A.; BUZZANCA, C.; D'AMICO, A.; DI STEFANO, V.; MELILLI, M. G. Development of functional gluten-free bread by incorporating amaranth and lentils: functional and nutritional aspects. **Applied Food Research**, v. 6, n. 1, p. 101844, 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.afres.2026.101844>

- PROETTO, I.; PESCE, F.; ARENA, E.; GRASSO, A.; PARAFATI, L.; FALLICO, B.; PALMERI, R. Use of vegetable flours obtained from artichoke by-products as a functional ingredient in gluten-free bread formulations. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 38, p. 101015, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2024.101015>
- RAMMOHAN, Y.; SHUPRAJHAA, T.; KUMAR, P. S.; VASUDEVAN, V.; SIVAPRASAD, M.; PRASAD, T. N. V. K. V.; KRISHNA, V. N. P. S.; SIREESHA, Y. Impact of maturity stages and modification processes on resistant starch and starch properties of green banana flour and its glycaemic response. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 311, p. 143881, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.143881>
- ROSADO, C. P.; ROSA, V. H. C.; MARTINS, B. C.; SOARES, A. C.; SANTOS, I. B.; MONTEIRO, E. B.; MOURA-NUNES, N.; DA COSTA, C. A.; MULDER, A. D. R. P.; DALEPRANE, J. B. Resistant starch from green banana (*Musa* sp.) attenuates non-alcoholic fat liver accumulation and increases short-chain fatty acids production in high-fat diet-induced obesity in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 1066–1072, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.199>
- RÓŻAŃSKA, M. B.; ZEMBRZUSKA, J.; RYCHLEWSKI, P.; KIDOŃ, M.; MASEWICZ, Ł.; MILDNER-SZKUDLARZ, S.; BARANOWSKA, H. M. Exploring the impact of dietary fiber enrichment on molecular water properties and indicators of Maillard reaction (furosine, N ϵ -carboxymethyllysine, and N ϵ -carboxyethyllysine) in model gluten-free bread. **Food Chemistry**, v. 491, p. 145194, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.145194>
- SADEGHI, A.; KARDOONI, Z.; EBRAHIMI, M.; ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. The role of water alternatives in bread formulation and its quality; An emerging source of sustainable and cost-effective bakery improvers. **Future Foods**, v. 12, p. 100733, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2025.100733>
- SADEGHIAN MOTAHAR, S. F.; ARIAENEJAD, S.; SALAMI, M.; EMAM-DJOMEH, Z.; SHEYKH ABDOLLAHZADEH MAMAGHANI, A. Improving the quality of gluten-free bread by a novel acidic thermostable α -amylase from metagenomics data. **Food Chemistry**, v. 352, p. 129307, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129307>
- SARABHAI, S.; TAMILSELVAN, T.; PRABHASANKAR, P. Role of enzymes for improvement in gluten-free foxtail millet bread: It's effect on quality, textural, rheological and pasting properties. **LWT**, v. 137, p. 110365, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110365>
- SEGUNDO, C.; ROMÁN, L.; GÓMEZ, M.; MARTÍNEZ, M. M. Mechanically fractionated flour isolated from green bananas (*M. cavendishii* var. nanica) as a tool to increase the dietary fiber and phytochemical bioactivity of layer and sponge cakes. **Food Chemistry**, v. 219, p. 240–248, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.143>
- SHENG, X.; CUI, Q.; YIN, H.; XI, Z.; YI, J.; ZHANG, H.; XU, X.; MA, Y. Application of hydrocolloids in the quality improvement of flour-based products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 164, p. 105211, 2025 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2025.105211>

- SHEWRY, P. R.; BELTON, P. S. What do we really understand about wheat gluten structure and functionality? **Journal of Cereal Science**, v. 117, p. 103895, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2024.103895>
- SHINI, V. S.; BILLU, A.; SUVACHAN, A.; NISHA, P. Exploring the nutritional, physicochemical and hypoglycemic properties of green banana flours from unexploited banana cultivars of southern India. **Sustainable Food Technology**, v. 2, n. 4, p. 1113–1127, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D4FB00066H>
- SPECTOR COHEN, I.; DAY, A.; SHAOUL, R. Should the Glu Be Ten or Twenty? An Update on the Ongoing Debate on Gluten Safety Limits for Patients with Celiac Disease. **Gastrointestinal Disorders**, v. 2, n. 3, p. 202–211, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/gidisord2030021>
- STRAGLIOTTO, L. K.; FERRARI, G. T.; CAMPAGNOL, P. C. B.; STRASBURG, V. J.; ZANDONADI, R. P.; OLIVEIRA, V. R. D. Green banana by-products on the chemical, technological and sensory quality of meat products. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 30, p. 100614, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2022.100614>
- SUTRISNO, A.; HUTASOIT, J. P.; MURTINI, E. S.; EFFENDI, F. D.; PRAKASH, S. Evaluation and analysis of transglutaminase-modified gluten-free soybean bread processed using ohmic heating with varied voltage levels. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 100, p. 103904, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2024.103904>
- SUWEERANON, J.; NAMKHAM, S.; YUTSAPREMANON, S.; TANGJAIDEE, P.; SAI-UT, S.; MAZUMDER, Md. A. R.; ZHANG, W.; JUNG, Y. H.; RAWDKUEN, S.; CHAIKHAM, P. Quality attributes and sensory characteristics of reduced-caloric Muscat cupcakes substituted with banana flour and monk fruit extract. **Applied Food Research**, v. 5, n. 2, p. 101351, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.afres.2025.101351>
- VIANA, L. M. *et al.* Green banana (*Musa* ssp.) mixed pulp and peel flour: A new ingredient with interesting bioactive, nutritional, and technological properties for food applications. **Food Chemistry**, v. 451, p. 139506, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139506>
- VILLANUEVA, M.; VICENTE, A.; NÁTHIA-NEVES, G.; RONDA, F. Microwave-treated rice flour halves the need of hydroxypropyl methylcellulose in the formulation of gluten-free bread. **Food Hydrocolloids**, v. 150, p. 109738, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.109738>
- VLAD, R.-A.; PINTEA, A.; PINTEA, C.; RÉDAI, E.-M.; ANTONOAEA, P.; BÎRSAN, M.; CIURBA, A. Hydroxypropyl Methylcellulose—A Key Excipient in Pharmaceutical Drug Delivery Systems. **Pharmaceutics**, v. 17, n. 6, p. 784, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17060784>
- WANG, A.; TONG, L.-T.; SCANNELL, A. G. M. Exploring the impact of leavening method on the characteristics of dough properties and bread quality: A review. **Food Chemistry**, v. 498, p. 147160, 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.147160>

WANG, Q.; WANG, P.; XIAO, Z. Resistant starch prevents tumorigenesis of dimethylhydrazine-induced colon tumors via regulation of an ER stress-mediated mitochondrial apoptosis pathway. **International Journal of Molecular Medicine**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3423>. Acesso em: 14 mar. 2026.

WANG, Y.; JIAN, C. Sustainable plant-based ingredients as wheat flour substitutes in bread making. **npj Science of Food**, v. 6, n. 1, p. 49, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41538-022-00163-1>

WAZIIROH, E.; BENDER, D.; JÄGER, H.; SCHÖNLECHNER, R. Ohmic baking of gluten-free bread: role of non-gluten protein on GF bread structure and properties. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 58, n. 2, p. 595–609, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ijfs.16206>

WAZIIROH, E.; BENDER, D.; SARIC, A.; JAEGER, H.; SCHOENLECHNER, R. Ohmic Baking of Gluten-Free Bread: Role of Starch and Flour on Batter Properties. **Applied Sciences**, v. 11, n. 14, p. 6567, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app11146567>

ZHANG, H.; LIU, S.; FENG, X.; REN, F.; WANG, J. Effect of hydrocolloids on gluten proteins, dough, and flour products: A review. **Food Research International**, v. 164, p. 112292, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112292>

ZHANG, J.; ZHU, Q.; CHENG, L.; KANG, J.; LIU, H.; ZHANG, L.; LI, H.; LI, Q.; GUO, Q.; GOFF, H. D. Enhancing gluten-free dough and bread properties using xanthan gum and its trifluoroacetic acid hydrolytes. **Food Hydrocolloids**, v. 164, p. 111204, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2025.111204>

ZHANG, Y.; XU, M.; ZHANG, X.; HU, Y.; LUAN, G. Application of zein in gluten-free foods: A comprehensive review. **Food Research International**, v. 160, p. 111722, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111722>

ZHAO, F.; LI, Y.; LI, C.; BAN, X.; CHENG, L.; HONG, Y.; GU, Z.; LI, Z. Co-supported hydrocolloids improve the structure and texture quality of gluten-free bread. **LWT – Food Science and Technology**, v. 152, p. 112248, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112248>

ZIENA, A. H.; ZIENA, H. M. Formulation of high-protein gluten-free pasta using lupine, whey protein concentrate, and Psyllium: Nutritional and functional quality assessment. **Applied Food Research**, v. 6, n. 1, p. 101661, 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.afres.2026.101661>

CAPÍTULO III

***Exploring β -Mannanase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 on Cocoa Bean Shell, Tamarind Peel, and Ora-Pro-Nobis for Enhanced Saccharification Processes**

* Publicado na 3 *Biotech* 15, 441 (2025)

Doi: <https://doi.org/10.1007/s13205-025-04595-w>



Exploring β -mannanase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 on cocoa bean shell, tamarind peel, and ora-pro-nobis for enhanced saccharification processes

Luise de Oliveira Sena¹ · Fabiane Neves Silva² · Igor Carvalho Fontes Sampaio³ · Grazielly de Jesus Silva³ · João Marcos Sena Chaves³ · Taise Amorim Ribeiro⁴ · Gabriel Lucas Silva de Jesus⁴ · Isabela Viana Lopes de Moura⁴ · Paulo Neilson Marques dos Anjos⁵ · Floriatan Santos Costa⁶ · Muhammad Irfan⁷ · Luiz Carlos Salay⁸ · Marcelo Franco³

Received: 30 May 2025 / Accepted: 19 October 2025 / Published online: 22 November 2025
© King Abdulaziz City for Science and Technology 2025

Abstract

The objective of this study was to investigate the production of β -mannanase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 via SSF and to evaluate its biochemical characteristics and application in the saccharification of corn straw. For this purpose, the Simplex-Centroid design was used, which indicated the best combination of substrates: 73.28% cocoa shell, 17.64% ora-pro-nobis and 9.09% tamarind shell. The Doehlert matrix defined the ideal fermentation conditions at 22 °C and 69% moisture content, resulting in an enzymatic activity of 104.27 U/g. The crude β -mannanase showed an optimum pH of 6.0, acidophilic characteristic, and was thermostable over a wide temperature range, with greater stability at 50 °C. CuCO_3 increased the enzymatic activity by 7.74%, and the solvents dichloromethane, ethyl ether, hexane and acetone by up to 18.96%, 4.63%, 1.10% and 77.16%, respectively. The enzyme is halotolerant, supporting up to 6 M NaCl, and showed high efficiency in the saccharification of corn straw, producing 133.29 mg/g of reducing sugars in 5 h. Scanning Electron Microscopy and FTIR analyses confirmed its effectiveness in the depolymerization of biomass, highlighting its potential for applications in various industrial sectors, especially in the production of biofuels and bioproducts from lignocellulosic biomass.

Exploring β -Mannanase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 on Cocoa Bean Shell, Tamarind Peel, and Ora-Pro-Nobis for Enhanced Saccharification Processes

Luise de Oliveira Sena^a, Fabiane Neves Silva^b, Igor Carvalho Fontes Sampaio^c, Grazielly de Jesus Silva^c, João Marcos Sena Chaves^c, Taise Amorim Ribeiro^d, Gabriel Lucas Silva de Jesus^d, Isabela Viana Lopes de Moura^d, Paulo Neilson Marques dos Anjos^e, Floriatan Santos Costa^f, Muhammad Irfan^g, Luiz Carlos Salay^h, Marcelo Franco^{c*}

^aPost-Graduation Program in Food Engineering and Science, Department of Exact Science and Natural, State University of Southwest Bahia, Itapetinga 45700-000, Brazil

^bFood Technology Center, Federal Institute of Education, Science and Technology of Baiano, Uruçuca Campus, Bahia, 45680-000, Brazil

^c*Biotransformation and Organic Biocatalysis Research Group, Department of Exact and Technological Sciences, Santa Cruz State University, Ilhéus, 45654-370, Brazil*

^d*Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, 40110-100, Brazil*

^e*Laboratory of Research and Innovation of Advanced Materials, Department of Exact Science, Santa Cruz State University, Ilhéus, 45654-370, Brazil*

^f*Department of Chemistry, Federal University of Paraná, 80060-000 Curitiba, Parana, Brazil*

^g*Department of Biotechnology, Faculty of Science, University of Sargodha, Sargodha, 40100, Pakistan*

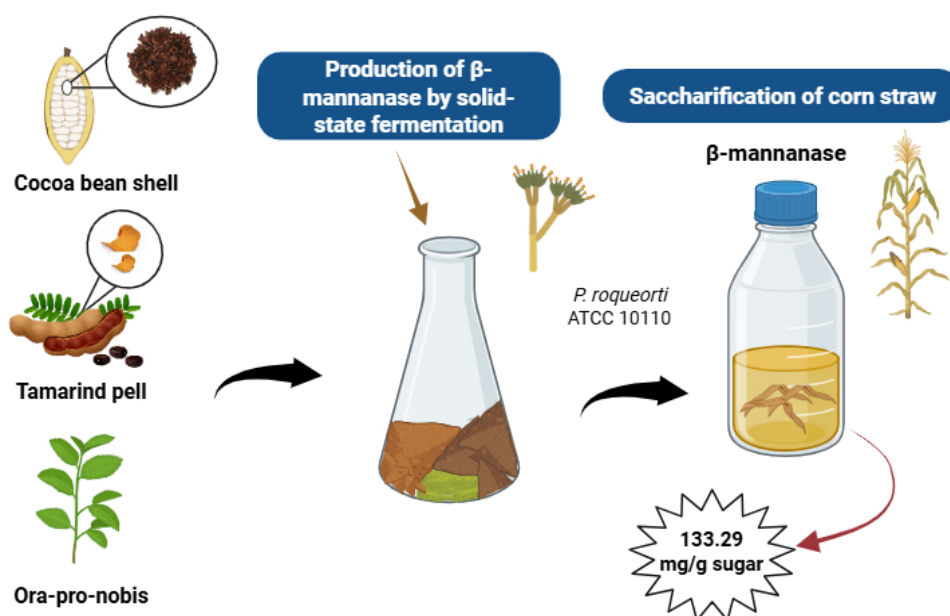
^h*Department of Exact Sciences, Santa Cruz State University, Ilhéus, 45654-370, Brazil*

*Corresponding Author: Marcelo Franco

Phone = +55 073 3231 4158; Fax = +55 073 3680 5355;

e-mail = mfranco@uesc.br

Graphical Abstract



Abstract

The objective of this study was to investigate the production of β -mannanase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 via SSF and to evaluate its biochemical characteristics and application in the saccharification of corn straw. For this purpose, the Simplex-Centroid design was used, which indicated the best combination of substrates: 73.28% cocoa shell, 17.64% ora-pro-nobis and 9.09% tamarind shell. The Doehlert matrix defined the ideal fermentation conditions at 22 °C and 69% moisture content, resulting in an enzymatic activity of 104.27 U g⁻¹. The crude β -mannanase showed an optimum pH of 6.0, acidophilic characteristic, and was thermostable over a wide temperature range, with greater stability at 50 °C. CuCO₄ increased the enzymatic activity by 7.74%, and the solvents dichloromethane, ethyl ether, hexane and acetone by up to 18.96%, 4.63%, 1.10% and 77.16%, respectively. The enzyme is halotolerant, supporting up to 6 M NaCl, and showed high efficiency in the saccharification of corn straw, producing 133.29 mg/g of reducing sugars in 5 hours. Scanning Electron Microscopy and FTIR analyses confirmed its effectiveness in the depolymerization of biomass, highlighting its potential for applications in various industrial sectors, especially in the production of biofuels and bioproducts from lignocellulosic biomass.

Keywords: Hemicellulase, mannan, solid state fermentation, agro-industrial waste, enzymes.

1. Introduction

Hemicellulose is one of the main polysaccharides present in lignocellulosic materials, composing approximately 20-30% of the plant cell wall (Costa et al. 2023). This polysaccharide is formed by three main components: xylans, xyloglucans and mannans (Purohit and Yadav 2020). One of the main polysaccharides present in these materials is mannan (Ahirwar et al. 2016), which can be found abundantly in wood, tubers, plant seeds and beans (Malgas et al. 2015). Its structure is composed of mannose units joined by 1,4- β -mannosidic bonds, in addition to glucose units present in the main chain and galactose units in the side chains (Srivastava and Kapoor 2017; Ismail et al. 2019).

Mannan degradation occurs due to the synergistic action of a specific set of enzymes from the glycosyl hydrolase family (Costa et al. 2023). This enzymatic process results in the formation of mannoooligosaccharides (MOS) and simple sugars, such as mannose (Karahalil et al. 2020).

MOS are classified as short-chain oligosaccharides and have attracted attention due to their significant prebiotic potential (Wongsiridetchai et al. 2021). Recent studies have shown that MOS stimulates the growth of *Lactobacillus* strains, promoting the formation of branched-chain amino acids, short-chain fatty acids and biofilm, demonstrating efficacy in promoting a healthy intestinal microbiota and, consequently, improving overall health (Kumar Suryawanshi and Kango 2021).

Furthermore, it was shown that MOS can significantly inhibit obesity and insulin resistance in mice, emerging as a potential nutraceutical to aid in weight loss and promote intestinal health (Yan et al. 2019). MOS have been used as a feed supplement to improve the ruminal environment in beef cattle susceptible to subacute ruminal acidosis (Garcia Diaz et al. 2018), and in fish feed formulation, demonstrating potential as additives in carbohydrate-rich diets, promoting weight gain, improving metabolic homeostasis, and suppressing the inflammatory response in juvenile tilapia (Wang et al. 2022).

The enzymatic hydrolysis of mannan to obtain MOS therefore emerges as a relevant practice, with broad implications in the food, pharmaceutical, and feed production sectors. In the mannan hydrolysis process, endo- β -mannanase catalyzes the random cleavage of the internal 1,4- β -mannosidic glycosidic bonds that make up the mannan/heteromannan structure, resulting in smaller molecules, such as β -1,4-manno-oligosaccharides and monosaccharides, such as mannose (Bhaturiwala et al. 2022). α -galactosidase and acetyl mannan esterase hydrolyze the side chain substituents present in galactomannan and galactoglucomannan. In parallel, β -mannosidase, an exo-acting enzyme, hydrolyzes manno-oligosaccharides at the non-reducing terminal ends (Karahalil et al. 2020), releasing mannose monomers (Xie et al. 2020). Additionally, β -glucosidases play an essential role by removing 1,4-glucopyranose units from the non-reducing ends of oligomers resulting from the degradation of glucomannans and galactoglucomannans (Karahalil et al. 2020).

β -mannanase is widely used in several industrial sectors. In the detergent industry, it acts as an additive in removing mannan-based food stains from cotton fabrics (Ismail et al. 2019). In the food industry, it is used in the clarification of juices (Zhao et al. 2020) and in reducing the viscosity of coffee extracts (Chauhan et al. 2014). In agriculture, it improves hormonal profiles, performance and nutrient availability in broiler chickens (Caldas et al. 2018). In the pulp and paper industry, it is used in the biobleaching of rice straw pulp (Patel and Dudhagara 2020). In the oil industry, it stands out for reducing the viscosity of hydraulic fracturing fluids based on guar gum (You et al. 2016). Furthermore, this enzyme plays a crucial role in the production of fermentable sugars to generate products with bioenergy potential (Kaur et al. 2020).

β -mannanase can be produced through solid-state fermentation (SSF), a biotechnological technique that uses solid substrates as sources of nutrients and support for the growth of microorganisms, in the absence or with reduced amounts of free water (De Menezes et al. 2023). Filamentous fungi are widely used in SSF due to their adaptability to these conditions, which simulate their natural habitat (De Menezes et al. 2023), in addition to secreting a wide variety of enzymes with high yields (Oliveira et al. 2018; De Carvalho et al. 2023). The use of agro-industrial waste as a substrate in SSF has been shown to be effective due to the varied composition of these substances, which includes proteins, sugars, and minerals that favor microbial growth (Sadh et al.

2018). Furthermore, these residues are widely available and considered low-cost raw materials. Therefore, the incorporation of agro-industrial residues for enzyme production emerges as a promising strategy to minimize production costs, culminating in obtaining a final product with greater economic viability (Da Silva Nunes et al. 2020). This practice not only reduces costs but also contributes to the valorization and effective management of waste, promoting greater sustainability in the process (Arpit Singh et al. 2022).

In this context, several fungal species were cultivated in different agro-industrial residues as a solid substrate to produce β -mannanase. Among them, the following stand out: *Aspergillus terreus* FBCC 1369, cultivated in palm kernel cake, with enzymatic activity (EA) of 41 U/g (Soni et al. 2015); *Trichoderma longibrachiatum* RS1, cultivated in rice straw, with AE of 89.73 U/g (Ismail et al. 2019); *Penicillium citrinum*, using açai seed residue, with AE of 29 U/mg-1 of protein (Lima et al. 2021); *Malbranchea cinnamomea* NFCCI 3724, grown in copra bran, with AE of 131 U/g (Ahirwar et al. 2016); and *Pyrenophora phaeocomes*, grown in different residues, such as defatted rice bran (AE of 51.04 U/g), mausami husks (AE of 44.23 U/g), sarkanda (AE of 40.94 U/g) and kitchen waste (AE of 37.36 U/g), standing out for producing β -mannanase with higher enzymatic activity (Rastogi et al. 2016).

Cocoa bean shells and tamarind shells, both wastes generated abundantly by the food industry in tropical countries, are rich in carbon sources, vitamins and inorganic cofactors essential for the growth of filamentous fungi and the production of enzymes. In addition, ora-pro-nobis, a highly available but often undervalued source of plant protein, has the potential to provide the necessary support and balance to the nitrogen demands of filamentous fungi growth. Therefore, the incorporation of these substances at optimal concentrations in solid-state fermentation (SSF) processes shows promise as low-cost and high-performance substrates for enzyme production, while promoting a more sustainable and environmentally responsible approach to industrial operations.

In this study, Simplex-Centroid and Doehlert statistical designs were used to improve the production of β -mannanase enzyme by the fungus *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 by solid-state fermentation (SSF). The enzyme *blend* (EB) an unpurified extract obtained after SSF was biochemically characterized regarding stability and influence of pH, thermostability, as well as the effects of salts, organic compounds, solvents and halotolerance on enzyme activity. The hypothesis of this study is that the application of EB will result in high conversion of biomass into fermentable sugars.

To test the hypothesis, EB was applied to the saccharification of corn straw, a byproduct widely produced by the agroindustry. The resulting solid was analyzed using scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in order to evaluate the

performance of the enzymatic hydrolysis of corn straw. These results were discussed aiming at directing more efficient and sustainable industrial processes for bioenergy production.

2. Materials e methods

2.1. Lignocellulosic biomass

Tamarind shell (T) was obtained from producers in southern Minas Gerais, Brazil. Cocoa bean shell (CBS) was supplied by producers in southern Bahia. Ora-pro-nóbis (OPN) (*Pereskia aculeata* Mill.) was purchased from producers in the city of Lavras, Minas Gerais. Corn straw (CS) was obtained from producers in Itabuna, Brazil. All these materials were dried in an oven with air circulation at 65 °C for 24 h and subsequently ground in a knife mill (ACB Labor®, Wiley, Brazil) to obtain particles with a particle size of 2.0 mm. The powder obtained was stored in plastic containers for later use in the experiment.

The contents of cellulose, hemicellulose, lignin, acid detergent fiber (ADF), neutral detergent fiber (NDF), crude protein (CP), lipids, dry matter and ash of agro-industrial residues and biomass were determined according to (Kumar et al. 2015b) and expressed as a percentage.

2.2. Preparation of *Penicillium roqueforti* ATCC10110 inoculum

The fungus *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 was provided by the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and duly deposited at the National Institute for Quality Control in Health (INCQS, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) under registration number: 40075 and lot: 079840075. The fungus was preserved in silica and glycerol and kept at -80 °C in an ultrafreezer. For subculture, the fungus was grown in Potato-Dextrose-Agar (VETEC ®) and Agar-Agar (VETEC ®) in 250 mL Erlenmeyer flasks previously sterilized (121 °C/1 atm/15 minutes) for 7 days in a BOD incubator at ±25 °C. After the incubation period, spores were collected using 0.01% (v/v) Tween 80 (VETEC ®) and sterile glass beads. The Tween 80 solution was added onto the surface of the agar culture, and sterile glass beads were gently rolled across the agar surface to detach the spores and transfer them into the solution, thus forming a homogeneous spore suspension. Spore counting of the suspension was performed using a double-mirrored Neubauer chamber and binocular microscope (L1000, BIOVAL ®, São Paulo, Brazil).

2.3. Solid state fermentation

The fermentation process was carried out using 125 mL Erlenmeyer flasks containing 5.5 g of the mixture of lignocellulosic components (T, OPN and CBS) sterilized in an autoclave (121 °C/1 atm/15 minutes). After cooling, the sterile substrate was inoculated with 10⁷ spores per gram

of substrate and moistened with sterile distilled water until the desired moisture value was determined (65%). The Erlenmeyer flasks were kept in a BOD incubator at 25 °C for 7 days.

After fermentation, 50 mL of distilled water were added to the fermented substrate and the mixture was shaken in a shaker incubator (QUIMIS, São Paulo, Brazil) at 30 °C and 200 rpm for 30 minutes. The liquid phase was separated by mechanical pressing and gauze permeation, followed by centrifugation (80-2B-15 mL, Centrilab) for 10 minutes at 4000 rpm. The supernatant obtained was called enzyme *blend* (EB) and stored frozen.

2.3.1. Multivariate optimization

The experimental conditions were optimized using a mixture design (MD) and a Doehlert design (DD). In the MD, the application of a substrate composed of cocoa bean shell (CBS), ora-pro-nobis (OPN), and tamarind (T) was evaluated, considering the following restrictions for the components: CBS ranging from 3.25 to 5.25 g, OPN ranging from 0.25 to 1.25 g and T ranging from 0.25 to 0.75 g. Final conditions were determined based on previous tests. After obtaining the appropriate substrate for the process, the DD was used to establish the fermentation conditions, considering the study of temperature (TP) and moisture content (MC) at 20 to 30 °C and 65 to 85%, respectively.

Enzyme activity (U g⁻¹) was used as an experimental response to obtain mathematical models, estimate errors and determine the optimal point. The models were evaluated using the analysis of variance (ANOVA) parameters, including the determination of the statistical significance of the regression, the evaluation of the adjustment using the F test and the coefficient of determination (R²) (Bezerra et al. 2008);(G. Novaes et al. 2018) . Data were processed using the Statistica 12 software (StatSoft, Tulsa, United States), with a confidence level of 95% (p = 0.05).

2.3.2. Determination of β -mannanase enzymatic activity

The enzymatic activity of β -mannanase was determined according to (Karahalil et al. 2020). For this, a 0.05% locust bean gum solution (Sigma-Aldrich, USA) was prepared in sodium citrate buffer (100 mM pH 6). The reaction was performed in test tubes containing 900 μ L of substrate and 100 μ L of EB. The blank was prepared by adding 100 μ L of substrate and 900 μ L of buffer, while the control tube was prepared with 100 μ L of EB and 900 μ L of buffer. The mixture was incubated in a water bath (TE-054; Tecnal) at 50 °C for 5 minutes. Subsequently, 1.5 mL of DNS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Miller 1959) were added to the tubes, followed by incubation at 90 °C for 15 minutes. The reaction was stopped by cooling in an ice bath. The absorbance was

measured in a spectrophotometer at 540 nm (SF200DM-UV Vis; Bel Photonics, Osasco, Brazil). A D-mannose calibration curve was used as a standard (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at different concentrations (from 0.1 to 1.2 $\mu\text{mol/mL}$) from the stock solution (10 $\mu\text{mol/mL}$). One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that released 1 μmol D-mannose at 50 °C per minute (Karahalil et al. 2020). The results were expressed in U g^{-1} .

2.4. Biochemical characterization

2.4.1. Optimum pH and pH stability

The pH of the reaction for maximum β -mannanase activity was determined by conducting the assays at different pHs (3-9) at 50 °C. For this, the EB was diluted twice in sodium citrate buffer (0.05 M, pH 3.4 and 5), sodium phosphate buffer (0.05 M, pH 6 and 7) and tris-HCl buffer (0.05 M, pH 8 and 9). For stability assays, the EB was incubated in different buffers (pH 3-9) at 50 °C for 5 h. Aliquots were collected at time zero and subsequently at 1-h intervals and subjected to the β -mannanase activity assay. Responses were expressed as relative activity (%), considering the pH of highest activity as 100% (De Brito et al. 2017).

2.4.2. Thermostability

Thermal stability was assessed by incubating EB diluted in sodium citrate buffer (100 mM, pH 6) at different temperatures (40–80 °C) for 5 h. Aliquots were removed at 1-h intervals and subjected to determination of β -mannanase activity. Responses were expressed as relative activity (%) with the highest enzymatic activity at the best temperature considered as 100% (De Brito et al. 2017).

2.4.3. Effect of salts and organic compounds

The effect of the metal salts CuSO_4 , FeSO_4 , CoSO_4 , MgSO_4 , $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, NaCO_3 , CaCl_2 and $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, were evaluated regarding the enzymatic activity, all at the concentration of 2 mmol/L^{-1} of reaction medium (Oliveira et al. 2018). The assays consisted of incubating the EB in sodium citrate buffer (100 mM, pH 6.0) containing the additives for 5 minutes of reaction at 50 °C. The results were expressed as relative activity (%), and the enzymatic activity without added salts was considered as 100% (Oliveira et al. 2018; Costa et al. 2023).

The organic compounds ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA), T-octyl-phenoxy-polyethoxy-ethanol (Triton X-100), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) and lactose were evaluated for enzymatic activity, all at a concentration of 2 mmol/L^{-1} of reaction medium. The assays consisted of incubating the EB in sodium citrate buffer (100 mM, pH

6.0) with the additives for 5 minutes of reaction at 50 °C. The results were expressed as relative activity (%), and the enzymatic activity without addition of organic compounds was considered as 100% (Oliveira et al. 2018).

2.4.4. Effect of solvents

The influence of the organic solvents acetone, dichloromethane, ethyl ether, hexane, methanol, ethyl alcohol, N-dimethylformamide (DMF) and dimethyl sulfoxide (DMSO) was also evaluated on the enzymatic activity of β -mannanase. The assays consisted of incubating the EB in sodium citrate buffer (100 mM, pH 6.0) containing the solvents at different concentrations (10, 20, 30 and 40%) for 5 minutes of reaction at 50 °C. The results were expressed as relative activity (%), the enzymatic activity without added solvents considered as 100% (Oliveira et al. 2018).

2.4.5. Halotolerance

To evaluate the tolerance of β -mannanase from *P. roqueforti* ATCC 10110 to salt, different concentrations of NaCl (0.01 M, 0.05 M, 1 M, 2 M, 3 M, 4 M, 5 M and 6 M) previously diluted in water were added to the reaction medium. Subsequently, the determination of β -mannanase activity was performed and the results were expressed as relative activity (%) and the enzymatic activity without addition of NaCl was considered as 100% (Silva et al. 2018).

2.5. Enzymatic saccharification of corn straw

The enzymatic saccharification step was performed using corn straw as agro-industrial waste. To carry out the process, the optimal pH and temperature conditions determined in the study were used to achieve maximum enzymatic activity of β -mannanase. Thus, the EB used in the saccharification was obtained using 0.05 M sodium citrate buffer pH 6.0 in the extraction step. The reaction medium consisted of 50 mL of EB added with 1% of the residue. The control consisted of 50 mL of EB without residue, while the blank contained residue and 50 mL of 0.05 M sodium citrate buffer pH 6.0.

Saccharification was carried out in a water bath at 50 °C under constant stirring for 6 hours. The reducing sugars present in the liquid phase were quantified by the DNS method (Miller 1959), before incubation and subsequently, at 1-hour intervals. Absorbance was measured in a spectrophotometer at 540 nm (SF200DM-UV Vis; Bel Photonics, Osasco, Brazil)

2.5.1. Scanning electron microscopy

The structural differences on the residue surface after 6 hours of enzymatic saccharification were observed through Scanning Electron Microscopy (SEM). The saccharified solid (control and

reaction) were previously dried in an oven at 105 °C for 4 hours and stored in eppendorfs for later analysis. The samples were deposited on a “Stub”, and the readings were performed in ambient mode. SEM images were obtained using a Quanta 250 (FEI Company) at a voltage of 15 kV (Almeida Lessa et al. 2023).

2.5.2. Fourier Transform Infrared Spectroscopy-FTIR

The analysis was conducted to examine the chemical profile, identifying functional groups. The FTIR spectra of the saccharified corn straw (pre-dried in an oven at 105 °C) and the blank were analyzed by MIR in a Fourier Transform Infrared Spectrometer with Attenuated Reflection (FTIR-ATR) AgilentCary® 630 (Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) and the spectra were obtained in the region of 4000 to 600 cm^{-1} , resolution of 4 cm^{-1} , 64 scans with a diamond crystal cell, at room temperature (± 24 °C).

3. Results and discussion

3.1. Lignocellulosic biomass

The composition of lignocellulosic biomass plays a crucial role in solid-state fermentation (SSF), significantly influencing enzyme production and microbial growth. The lignocellulosic fraction can act as an inducer or inhibitor of lignocellulolytic enzyme production (Leite et al. 2021). Table 1 presents the physicochemical composition of the biomasses used in the study.

Table 1. Physicochemical composition of different agro-industrial residues and biomass. Experiments were performed in triplicate, and values are presented as mean $\pm$ standard deviation.

Parameters (%)	Lignocellulosic residue/biomass			
	CS	CBS	T	OPN
Cellulose	30.12 $\pm$ 0.748	20.81 $\pm$ 0.193	31.55 $\pm$ 0.559	5.29 $\pm$ 0.086
Hemicellulose	55.53 $\pm$ 0.332	10.78 $\pm$ 0.839	23.76 $\pm$ 0.670	24.84 $\pm$ 1.072
Lignin	0.98 $\pm$ 0.367	17.04 $\pm$ 0.510	20.11 $\pm$ 0.585	2.05 $\pm$ 0.108
ADF	31.10 $\pm$ 1.115	36.62 $\pm$ 0.092	51.67 $\pm$ 0.026	7.14 $\pm$ 0.070
NDF	86.63 $\pm$ 0.783	49.78 $\pm$ 0.485	75.37 $\pm$ 0.468	33.01 $\pm$ 0.308
Crude protein	4.76 $\pm$ 0.178	21.16 $\pm$ 0.244	7.54 $\pm$ 0.351	34.83 $\pm$ 0.817
Lipids	3.10 $\pm$ 0.103	10.14 $\pm$ 0.322	2.61 $\pm$ 0.182	6.44 $\pm$ 0.0074
Ashes	0.26 $\pm$ 0.00	1.52 $\pm$ 0.026	1.33 $\pm$ 0.090	0.58 $\pm$ 0.108

CS- Corn straw; CBS- Cocoa bean shell; T- Tamarind peel; OPN- Ora-pro-nóbis; ADF- Acid detergent fiber; NDF- Neutral detergent fiber.

Cellulose and hemicellulose are crucial carbon sources for microbial growth. Among the residues analyzed, hemicellulose content was highest in CS (55.53%), followed by T (23.76%) and OPN (24.84%). Although CBS exhibited the lowest hemicellulose content (10.78%), it still represents a significant source of structural carbohydrates. Therefore, all evaluated residues have the potential to stimulate the synthesis of hemicellulolytic enzymes (Sosa-Martínez et al., 2023), such as β -mannanase, highlighting their relevance as alternative substrates in biotechnological processes. On the other hand, lignin, found in high levels in T (20.11%) and CBS (17.04%), may represent a physical barrier, hindering the access of enzymes to cell wall polysaccharides and, consequently, inhibiting microbial growth. Furthermore, lignin has antimicrobial properties that can further limit the development of fungi (Alzagameem et al. 2019), such as *P. roqueforti*.

The protein content, particularly high in OPN (34.83%), is essential, as proteins are an important source of nitrogen for microbial metabolism and enzyme production (Zhang et al. 2025). The presence of lipids and ash, although in smaller amounts, also plays a significant role, with the low ash contents observed indicating a limited availability of minerals and micronutrients, which are essential enzymatic cofactors (Ohara et al. 2015).

Therefore, despite variations in waste compositions, the combination of these materials can provide an adequate nutritional balance to optimize the SSF process and maximize β -mannanase production. However, the high lignin concentration may require pretreatments to increase polysaccharide accessibility, ensuring more efficient fermentation and higher enzyme production.

3.2. Multivariate optimization

The incorporation of agro-industrial waste into SSF is a relevant strategy, as it offers a variety of nutrients that promote microbial growth and the production of several enzymes, contributing to environmental sustainability. Generally, the combination of different wastes is adopted to ensure the availability of all essential nutrients, while stimulating the production of the desired enzymes (Bangoria et al. 2021).

The composition of the substrate formed by CBS, OPN, and T was optimized using a Simplex-centroid mixture design. The three components have been shaped to obtain the ideal proportions that provide maximum enzymatic activity. Thus, a total of 11 experiments were performed and the experimental response obtained are presented in Table 2.

An initial analysis revealed that the fungus *P. roqueforti* ATCC 10110 synthesized the enzyme β -mannanase using any of the combinations analyzed, according to the experimental design (Table 2). Although enzyme production occurred in all tests, variations in factor levels led to a variation in enzyme activity from 71 U g⁻¹ to 113.55 U g⁻¹. The highest activity was observed under the conditions of Experiment 6 (4.75 g CBS; 0.25 g OPN; 0.50 g T), with a response of 113.55 U g⁻¹, followed by the central point replicates (4.25 g CBS; 0.75 g OPN; 0.50 g T) with an average of 108.36 U g⁻¹. The high hemicellulose content present in the residues used in the mixture (CBS: 10.78%, T: 23.76, OPN: 24.84) (Table 1) may have induced the production of β -mannanase by the microorganism.

Recent research has used *P. roqueforti* ATCC 10110 in SSF to produce lipases using cocoa shells (Sales De Menezes et al. 2021), xylanases in sugarcane bagasse (Souza et al. 2018), endoglucanase and exoglucanase in cashew residue (Souza et al. 2018). This fact demonstrates the ability of *P. roqueforti* to develop in different substrates, showing promise for obtaining several enzymes.

Table 2. Mixture design matrix with constraints, showing the coded and actual values (in parentheses) for β -mannanase production by *P. roqueforti* ATCC 10110 under solid-state fermentation, along with the experimental responses for enzymatic activity (U g⁻¹). Experiments were performed in triplicate, and values are presented as mean $\pm$ standard deviation.

Experiment	CBS – A (g)	OPN – B (g)	T – C (g)	Enzymatic activity (U g ⁻¹)
1	5.00 (0.91)	0.25 (0.05)	0.25 (0.05)	71.00 $\pm$ 0.001
2	4.00 (0.73)	1.25 (0.23)	0.25 (0.05)	88.55 $\pm$ 0.003
3	4.50 (0.82)	0.25 (0.05)	0.75 (0.14)	75.64 $\pm$ 0.00
4	3.50 (0.64)	1.25 (0.23)	0.75 (0.14)	91.73 $\pm$ 0.001
5	4.75 (0.86)	0.25 (0.5)	0.50 (0.09)	80.45 $\pm$ 0.002
6	3.75 (0.68)	1.25 (0.23)	0.50 (0.09)	113.55 $\pm$ 0.004
7	4.50 (0.82)	0.75 (0.14)	0.25 (0.05)	98.27 $\pm$ 0.004

8	4.00 (0.73)	0.75 (0.14)	0.75 (0.14)	93.63 ± 0.002
9	4.25 (0.77)	0.75 (0.14)	0.50 (0.09)	112.27 ± 0.004
10	4.25 (0.77)	0.75 (0.14)	0.50 (0.09)	111.45 ± 0.003
11	4.25 (0.77)	0.75 (0.14)	0.50 (0.09)	101.45 ± 0.004

The data were used to obtain regression models and were evaluated using ANOVA (Table 3).

Table 3. Analysis of variance for the quadratic model obtained in the mixture design

Source of variation	SS	Df	MS	<i>p</i> -value
Regression	24.06	5	4.81	0.011
Lack of fit	1.41	3	0.47	0.515
Pure error	0.87	2	0.44	
Total	26.35	10		

Sum of squares (SS), degrees of freedom (Df), mean squares (MS)

The best fit was obtained for the quadratic model, according to the parameters determined in the ANOVA (Table 3). The regression showed a significant fit ($p < 0.05$) and no evidence of lack of fit, indicated by the non-significant parameter ($p > 0.05$), was observed. Furthermore, the regression showed a high predictive capacity, explaining 91.3% of the total variance ($R^2 = 0.913$). Therefore, the quadratic model was considered adequate to study the effects of the investigated factors, as shown in Fig. 1a, and to determine the optimal condition, which in this case corresponds to the maximum point.

All standardized effects were significant and exerted some influence on the system. The CBS (A) and OPN (B) components showed positive effects, indicating an increase in enzymatic activity with the increase in the proportion of these components in the mixture, while the T (C) showed a negative and little significant effect, with little influence on the response.

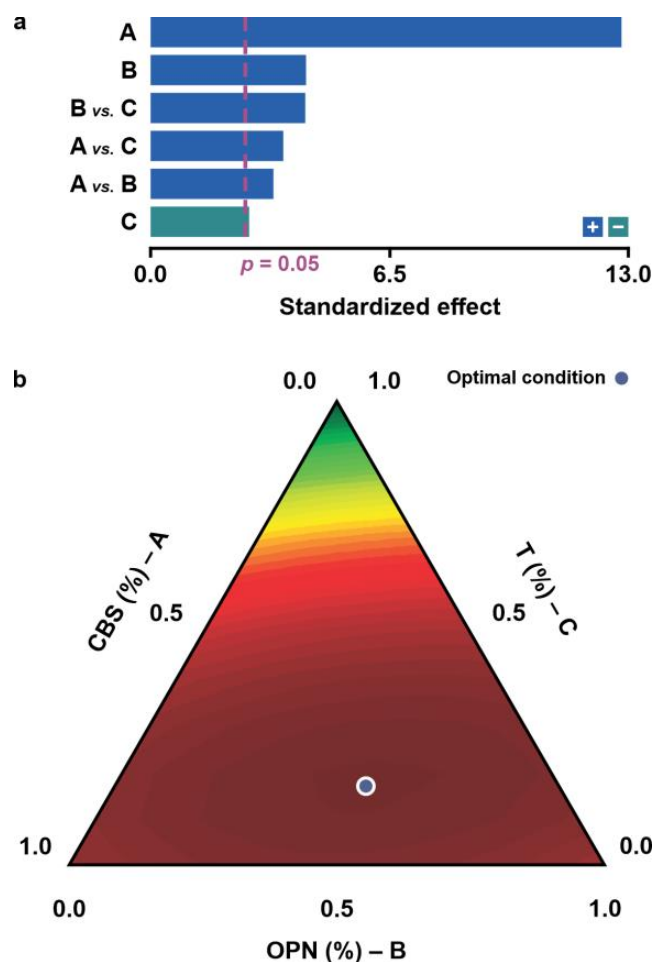


Fig. 1 Standardized effect for the investigated factors **(a)** and contour plot obtained from the quadratic model **(b)**

In the contour graph (Fig.1b), the variation of enzymatic activity is shown as a function of the levels of the components in the mixture. A central region with a high experimental response was observed, indicated by warm colors, which suggests a maximum region. Thus, the optimal condition was determined, using the following amounts (in grams) of the components to prepare the substrate: 4.03 g of CBS, 0.97 g of OPN, and 0.50 g of T. Under these conditions, the response predicted by the model was 111.36 U/g. To confirm whether the maximum region indicated in the contour plot for β -mannanase production reflects the predicted values, validation experiments were conducted. The formulation containing 4.03 g of CBS, 0.97 g of OPN and 0.50 g of T was used to maximize enzyme production. In experimental replication, an enzyme activity of 89.27 U/g (± 1.34) was determined. The predicted activity and the observed mean value demonstrated satisfactory predictive ability. and experimental results do not differ significantly, according to the Student's t-test, where a calculated T-value of 3.13 ($n = 3$ and 95% confidence) was obtained.

Previous studies reported that the fungus *Trichoderma longibachiatum* RS1 was able to produce β -mannanase with an enzymatic activity of 89.73 U/g under SSF using rice straw as a substrate (Ismail et al. 2019). On the other hand, the maximum β -mannanase activity by *Aspergillus*

oryzae MTCC 1846f was 434.6 U/g when grown on copra flour (Jana et al. 2018). Wheat bran (58.56 U/g), sawdust (20.35 U/g) and dried potato peel (46.95) were also used for β -mannanase production using the *Aspergillus niger* P-19 strain (Kaur et al. 2020).

The use of agro-industrial waste is advantageous due to its abundant availability, in addition to contributing to the development of low-cost processes (Da Silva Nunes et al. 2020). CBS is a byproduct generated by the chocolate industry after the roasting process (Nogueira Soares Souza et al. 2022). Among all the substrates analyzed, CBS was used in the largest proportion in the mixture (73.27%) to achieve maximum β -mannanase production. Thus, the research also contributes to adding value to the cocoa production chain, which is widely disseminated in the region of Ilhéus, Bahia.

It is worth noting that the fungus *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 secreted the enzyme β -mannanase in all combinations tested, without needing external sources of nutrients other than those already naturally present in the raw material.

After obtaining the ideal substrate composition, we investigated the experimental conditions applied to the fermentation process. Humidity and temperature were optimized using a Doehlert-type design. The matrix and the experimental response obtained in each experiment are presented in Table 4.

Table 4. Doehlert design matrix with the coded and actual values (in parentheses) for the independent variables (factors) initial moisture (A, %) and incubation temperature (B, °C), considering the dependent variable (response) as the enzymatic activity (U g⁻¹). Experiments were performed in triplicate, and values are presented as mean $\pm$ standard deviation.

Experiment	Moisture content – A (%)	Temperature – B (°C)	Enzymatic activity (U g ⁻¹)
1	85 (1)	25 (0)	68.36 $\pm$ 0.006
2	80 (0.5)	30 (0.866)	73.45 $\pm$ 0.001
3	65 (-1)	25 (0)	89.18 $\pm$ 0.001
4	70 (-0.5)	20 (-0.866)	104.45 $\pm$ 0.005
5	80 (0.5)	20 (-0.866)	72.54 $\pm$ 0.002
6	70 (-0.5)	30 (-0.866)	75.45 $\pm$ 0.004
7	75 (0)	25 (0)	102.55 $\pm$ 0.001
8	75 (0)	25 (0)	98.54 $\pm$ 0.000
9	75 (0)	25 (0)	94.55 $\pm$ 0.004

Mathematical models were obtained from experimental data and evaluated using ANOVA (Table 5).

Table 5. Analysis of variance for the quadratic model obtained in the mixture design

Source of variation	SS	Df	MS	<i>p</i>-value
Regression	18.81	5	3.76	0.023
Lack of fit	0.35	1	0.35	0.314
Pure error	0.39	2		
Total	19.55	8		

Sum of squares (SS), degrees of freedom (Df), mean squares (MS).

The quadratic model showed the best fit to the experimental data and was also statistically significant ($p < 0.05$). Furthermore, no lack of fit was observed ($p > 0.05$) and the regression showed a high predictive capacity ($R^2 = 0.962$). The quadratic model was considered adequate and used to determine the standardized effects of each factor (Fig. 2a), as well as their interactions in the experimental response and the determination of the optimal condition.

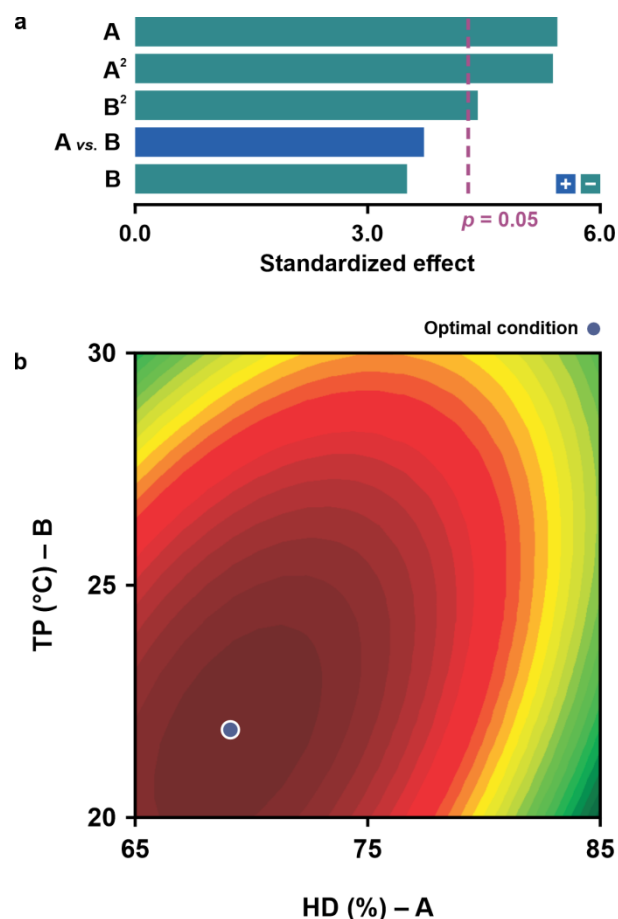


Fig. 2 Standardized effect for the investigated factors **(a)** and contour plot obtained from the quadratic model **(b)**

In Fig. 2b was observed a maximum region and the optimum point was obtained with the following conditions: moisture content of 69% and temperature of 22 °C. Applying these parameters, the model predicts an experimental response of 104.27 U/g. Regarding the non-optimized condition, an increase of 17% fold in enzymatic activity was determined.

The *Aspergillus niger* P-19 strain inoculated in rice straw with 83.3% moisture content and 28 °C, provided an activity of 47 IU/g (Kaur et al. 2020). *Penicillium aculeatum* APS1 cultivated in palm kernel cake and soybean meal with 52.25% moisture content at 30 °C reached 4696 U/g of enzymatic activity (Bangoria et al. 2021). An activity of 434.6 U/g was reported by *Aspergillus oryzae* MTCC 1846 secreted during SSF of copra meal at 74% moisture content and 28 °C (Jana et al. 2018).

The production of hemicellulases by filamentous fungi is highly influenced by cultivation conditions (Falkoski et al. 2013). Moisture levels above the ideal reduce substrate porosity, modify particle structure, leading to agglomeration and gummy texture, which impairs oxygen transfer (Zhang and Sang 2015). On the other hand, low moisture levels limit nutrient diffusion in

substrates, reduce expansion and increase water tension, preventing microbial growth (Kaur et al. 2020).

It is worth noting that due to the different water absorption capacities of different substrates, the same moisture content may not result in similar water availability for organism growth and enzyme secretion (Kaur et al. 2020).

Temperature plays a crucial role in the efficiency of SSF as the growth and development of enzymes or metabolites are generally affected by temperature (Chilakamarry et al. 2022). At very low temperatures, fungal growth may slow down or even stop, resulting in reduced substrate utilization and enzyme and metabolite production. On the other hand, excessively high temperatures may kill the fungi or lead to the production of toxins, resulting in an unsafe and undesirable fermentation product (Wang et al. 2022). Additionally, microorganisms may direct the energy obtained from the substrate to the synthesis of a limited number of proteins necessary for their growth and physiological processes. These high temperatures may also cause changes in the three-dimensional structure of enzymes, leading to denaturation (De Almeida Antunes Ferraz et al. 2020).

In this context, it is crucial to use statistical tools to optimize the fermentation process and thus achieve maximum enzyme production. In addition, this practice leads to a reduction in the number of experiments, analysis time, and savings in time and reagents (De Almeida Antunes Ferraz et al. 2020).

This study demonstrates the feasibility of producing the β -mannanase enzyme from *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in a simplified culture medium, without the addition of inducing compounds, surpassing results obtained in other studies reported in the literature. The absence of additives in the fermentation process makes it more sustainable, economical, and viable for industrial applications.

3.3. Biochemical characterization

3.3.1. Optimum pH and pH stability

The variation in enzymatic activity with changing pH is due to the protonation or deprotonation of amino acids in the active site, which influences the catalytic process (Bangoria et al. 2021). Thus, the research analyzed the impact of pH on the activity and stability of crude β -mannanase derived from *P. roqueforti* ATCC 10110. The investigations were carried out over a wide pH range, ranging from 3 to 9, and the results are presented in Fig. 3.

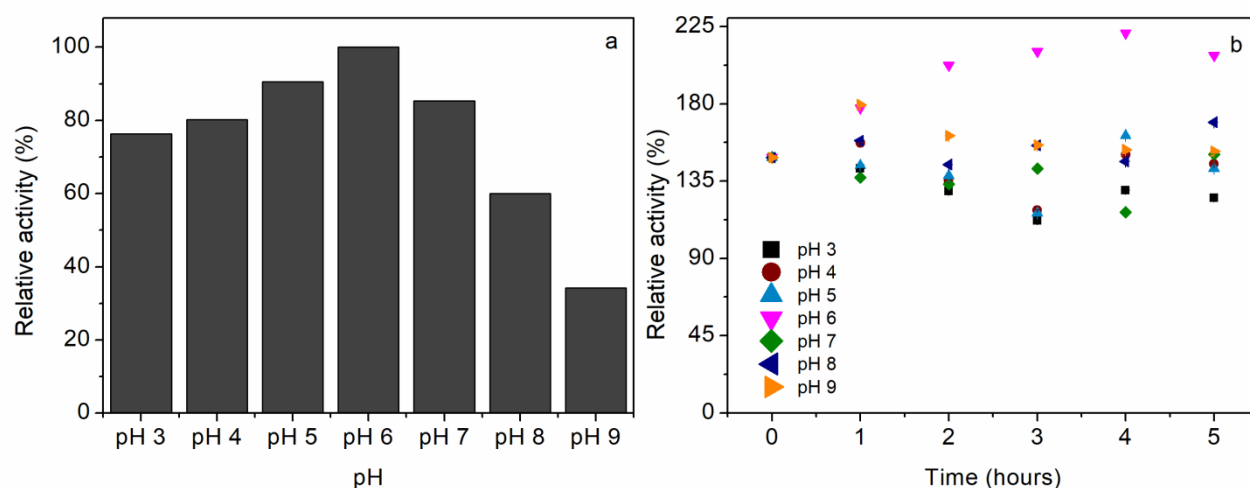


Fig. 3 (a) β -mannanase activity by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 under solid-state fermentation at different pH **(b)** pH stability profile

The results revealed that the highest activity values were maintained above 80% under acidic and slightly alkaline conditions, notably in the pH ranges from 4 to 7. pH 6 was identified as optimal for maximum β -mannanase activity (Fig. 3a). On the other hand, a more pronounced reduction of up to 65.75% of the relative activity was observed in alkaline media (pH >7). The enzymatic activity is reduced in higher pH ranges due to changes that occur in the conformational structure of the enzyme, more specifically in the catalytic site (Kumar et al. 2015a). Similar results were observed in a previous study with the β -mannanase from *Penicillium aculeatum* APS1, whose maximum activity was recorded at pH 6 (Bangoria et al. 2021). In turn, the β -mannanase from *Penicillium citrinum* showed an optimal pH value of 4.6 (Lima et al. 2021), while the partially purified enzyme from *Trichoderma longibrachiatum* RS1 exhibited maximum activity at pH 5.7 (Ismail et al. 2019). As shown in Fig. 3b, regardless of pH, β -mannanase retained activity >116.33% during 5 hours of incubation at 50 °C, with pH 6 standing out as the most stable. The results obtained are in line with other studies reported in the literature, indicating that acidic pH is the best for the activity of β -mannanases of fungal origin (Ahirwar et al. 2016; Ismail et al. 2019; Zhao 2020).

It is important to highlight that, since this is a crude extract containing several enzymes, it may include other compounds that also influence enzymatic activity, such as phenolic compounds. Studies were conducted to investigate the impact of various phenolic compounds on the activity of β -mannanase from *Clonostachys byssicola*. The results showed that all tested phenolic compounds inhibited the enzyme, reducing its activity (Costa et al. 2023). The inhibition mechanisms may involve the precipitation or irreversible aggregation of proteins, as well as the interaction of phenolic molecules with aromatic groups in the structure of certain enzymes (Costa et al. 2023). Although this is a relevant fact to be considered, it was not addressed in the present study.

Given the results, it is suggested that the studied β -mannanase has acidophilic and slightly alkaline characteristics, which makes it suitable for use in several industrial sectors, including bioconversion processes, since most of the raw materials are generally acidic (Liu et al. 2020). In the animal feed and coffee extraction industries, which require enzymes that act at acidic pH for efficient hydrolysis of heteromannan (Costa et al. 2023). pH stability is an important parameter to be evaluated, since the enzyme activity is affected by the concentration of hydrogen ions, which consequently promotes modifications in the catalytic site and conformation of the enzyme (Kaur et al. 2020).

3.3.2. Thermostability

The thermostability profile of crude β -mannanase from *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 was evaluated in the temperature range of 40 to 80 °C for 5 hours. The enzyme was shown to be thermostable in a wide temperature range, as shown in Fig. 4. However, the enzyme activity was highest at 40 and 50 °C, retaining activity of 127.32% and 129.01%, respectively, up to 5 hours of incubation.

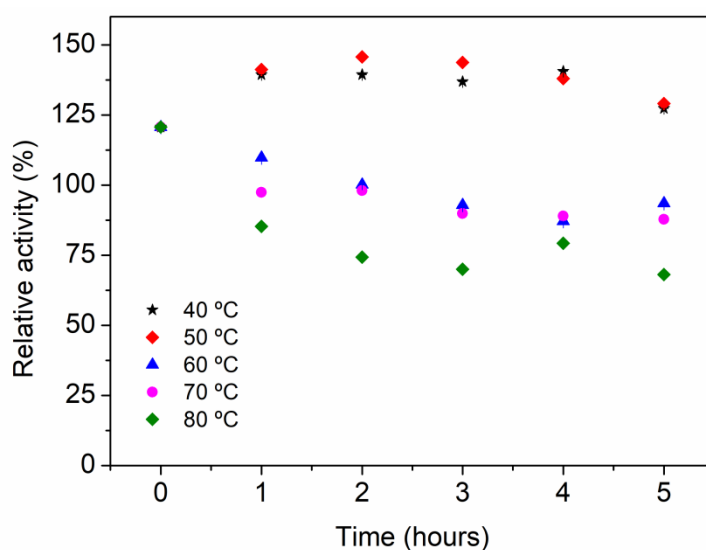


Fig. 4 Thermal stability profile of β -mannanase produced under solid-state fermentation using *Penicillium roqueforti* ATCC 10110

It was found that there was a decline in enzymatic activity with increasing temperature (>50 °C), but it is important to highlight that the enzyme retained 68.11% of its residual activity at 80 °C after 5 hours (Fig. 4). The results are similar to those obtained for the crude β -mannanase from *Clonostachys byssicola*, in which a reduction in enzymatic activity was observed with an increase in

temperature (Costa et al. 2023). Studies revealed that crude β -mannanase from *Penicillium aculeatum* APS1 was stable at 50 °C for 7 hours, maintaining activity of up to 75% (Bangoria et al. 2021). Crude β -mannanase from *Penicillium citrinum* retained 90% at 40 °C and 80% at 60 °C of the initial enzymatic activity in the first 2 h of incubation (Lima et al. 2021). As in studies conducted with the immobilized β -mannanase from *Aspergillus niger* P-19, the enzyme was more stable at 50 °C, which is a key characteristic for its application in prolonged enzymatic hydrolysis processes, allowing the maintenance of the enzyme's catalytic activity (Kaur et al. 2020).

Studies indicate that, under certain conditions, crude β -mannanase has greater thermal stability compared to the purified enzyme, since the purification process can remove proteins that contribute to this stability (Saleh et al. 2024). In the industrial context, crude β -mannanase from *P. roqueforti* ATCC 10110 stands out not only for its thermostability but also for reducing costs, since it reduces the need for additional purification steps. This makes the application of the enzyme more efficient and economical in industrial processes, maximizing its durability and functionality.

The studied β -mannanase was stable at 50 °C, making it ideal for the clarification of fruit juices, since the operation normally occurs in this temperature range. Furthermore, as it is part of an enzymatic *blend* that includes several other enzymes, it is especially effective in reducing juice turbidity and viscosity, caused by different polysaccharides. This enzymatic set hydrolyzes these compounds, resulting in a juice with better sensory acceptance and storage stability (Dawood and Ma 2020).

Although the enzyme shows greater stability at 50 °C, it maintained 68.11% of its enzymatic activity even at 80 °C, the highest temperature analyzed. This indicates that the enzyme is suitable for application in reducing the viscosity of guar-based fracturing fluids, acting as an efficient gelbreaker in oil fields (Dawood and Ma 2020).

Elevated temperatures above the optimum may compromise enzyme efficiency, triggering changes in protein folding and, consequently, promoting enzymatic denaturation (Shukor et al. 2016). On the other hand, a higher optimum temperature increases substrate solubility, accelerates the conversion process and reduces microbial contamination of processed materials (Saleh et al. 2024). These characteristics make β -mannanase from *P. roqueforti* ATCC 10110 an ideal choice for several biotechnological applications.

3.3.3. Effect of salts and organic compounds

Salts are capable of inhibiting or activating the enzyme through distinct mechanisms, including binding to their ligands, reaction with essential groups, as well as interaction with structurally relevant residues (Zhao 2020). The effects of various salts and organic compounds on the activity of β -mannanase from *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 are shown in Table 6.

Table 6. Relative activity of β -mannanase produced by solid-state fermentation using 5.5 g of a mixture of cocoa bean shell, Ora-pro-nobis, and tamarind peel with *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in the presence of different salts and organic compounds. The activity of the crude enzymatic extract without additives was considered 100% (control). Reaction conditions: metal salt concentration: 2 mmol L⁻¹; temperature: 50 °C; reaction time: 5 min. Experiments were performed in triplicate, and values are presented as mean $\pm$ standard deviation

Additives	Relative activity (%)
Control	100
CuSO ₄	107.74 $\pm$ 0.003
FeSO ₄	90.50 $\pm$ 0.007
CoSO ₄	69.75 $\pm$ 0.000
MgSO ₄	51.64 $\pm$ 0.001
Zn(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	88.04 $\pm$ 0.006
Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	85.05 $\pm$ 0.002
Na ₂ CO ₃	96.48 $\pm$ 0.000
CaCl ₂	95.43 $\pm$ 0.007
Al(NO ₃) ₃	58.85 $\pm$ 0.001
Trolox	68.87 $\pm$ 0.001
Lactose	62.19 $\pm$ 0.004
Triton X-100	61.31 $\pm$ 0.007
EDTA	58.32 $\pm$ 0.002

It is noted that among all the ions analyzed, CuSO₄ was the only one that promoted an increase in the residual activity of β -mannanase (7.74%) in relation to the control (without addition of salts) (Table 6). The β -mannanase of *Penicillium citrinum* also remained active in the presence of Cu²⁺ and Zn²⁺ (Lima et al. 2021). Cu²⁺ increased the activity of β -mannanase by *Aspergillus oryzae* MTCC 1846 by up to 130% (Jana et al. 2018), as well as activating the mannanase (ManB085) from *Alkalihalobacillus hemicellulosilyticus*, which exhibited an activity increase of up to 135.86% (Chen et al. 2025). Conversely, Cu²⁺ reduced the β -mannanase activity of *Malbranchea cinnamomea* by 20% (Ahirwar et al. 2016).

The results demonstrated a considerable inhibitory effect for the ions MgSO₄, Al(NO₃)₃ and CoSO₄, causing a reduction in β -mannanase activity of 48.36%, 41.15 and 30.25%, respectively (Table 6). Mg²⁺ and Ca²⁺ kept the β -mannanase of *Malbranchea cinnamomea* active with up to 100% activity, while Co²⁺ inhibited the enzyme activity by up to 32% (Ahirwar et al. 2016). In

contrast, the purified β -mannanase from *Stachybotrys chlorohalonata* (SCMan26) showed a 9.2% increase in activity in the presence of both Co^{2+} and Mg^{2+} at a concentration of 1 mmol/L compared to the control, highlighting that the effect of these ions may vary depending on the enzymatic source. (Wang et al. 2024).

Despite the reduction in residual activity resulting from the action of most salts in relation to the control, the enzyme remained active, retaining up to 51.64% of its initial activity (Table 6). Similar behavior was observed for β -mannanase from *Penicillium citrinum* (Lima et al. 2021). Furthermore, the ions FeSO_4 , $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, Na_2CO_3 and CaCl_2 exerted a slight effect on the enzyme activity at a concentration of 2 mmol/L⁻¹, with moderate losses of up to 14.95% (Table 6). However, Fe^{2+} and Fe^{3+} at a concentration of 10 mM promoted a significant inhibitory effect on the activity of the enzyme produced by *Clonostachys byssicola* (Costa et al. 2023). It is widely recognized that heavy metal ions have a high affinity for sulfhydryl groups (-SH), which normally promote irreversible inhibition of enzymatic activity (Zhou et al. 2018).

All organic compounds analyzed showed similar behavior, negatively affecting enzyme activity (Table 6). The chelating agent EDTA resulted in a decrease of up to 41.68% in residual activity, suggesting that β -mannanase from *P. roqueforti* ATCC 10110 is a metalloenzyme with a serine group in the active site (Saleh et al. 2024). This effect can be explained by the ability of EDTA to chelate essential metal ions, thereby compromising the catalytic efficiency of the enzyme (Silva et al. 2025). Similarly, it was observed that EDTA inhibited approximately 54% of the enzymatic activity of *Clonostachys byssicola* (Costa et al. 2023). This inhibitory effect was also reported in other studies (Zhao et al. 2020). However, the β -mannanase from *Malbranchea cinnamomea* maintained 100% of its activity (Ahirwar et al. 2016). On the other hand, there was an increase of 12.12% and 45.09% in the residual activity of β -mannanase from *Aspergillus oryzae* MTCC 1846, for EDTA and Triton X-100, respectively (Jana et al. 2018). Triton X-100 impacts the enzyme structure by promoting its polymerization in the structural region of the protein (Jana et al. 2018).

The concentration of salts and organic compounds has a strong influence on enzyme activity. Studies have shown that as the concentration of these components increased in the reaction medium (12 mM, 25 mM, and 50 mM), the activity of β -mannanase from *Lactobacillus casei* HDS-01 decreased significantly (Zhao et al. 2020). Furthermore, as demonstrated by the data obtained in the study and those previously reported in the literature, it was observed that the same salt and organic compound can exert different effects on the enzyme, inhibiting or activating it. In general, salts and organic compounds at a concentration of 2 mmol/L⁻¹ were not able to completely inactivate the enzyme activity.

These findings emphasize that the influence of salts and organic compounds on enzyme activity is highly dependent on the concentration and specific nature of the ions and compounds in question. The variability in the effects observed for different β -mannanases suggests that the molecular structure and the enzymatic microenvironment play critical roles in determining the response to these agents. Thus, this work not only corroborates previous studies but also expands the understanding of the conditions under which *P. roqueforti* β -mannanase may be most effective, providing a basis for future optimizations in industrial processes that utilize this enzyme.

3.3.4. Effect of solvents

The polarity of a solvent is a crucial parameter to consider, as it can impact enzymatic activity. Solvents can alter the interactions between water and the enzyme, in addition to penetrating the water layer that stabilizes it. Thus, the hydrophobicity of the solvent can be evaluated by the log P scale (Zhao 2020). The logarithm of the octanol-water partition coefficient (log P) reflects the behavior of molecules dissolved in water, serving as a good indicator of the solvent's ability to penetrate the aqueous layer surrounding the enzyme. Solvents with higher log P values are more hydrophobic, while lower values indicate that the solvent is more hydrophilic, directly influencing the way the solvent interacts with the enzyme (Zhao 2020).

To evaluate the effect of different solvents on the β -mannanase activity of *P. roqueforti* ATCC 10110, polar and nonpolar solvents with log P ranging from -0.24 to 3.98 were tested at concentrations of 10%, 20%, 30% and 40% (v/v) in the reaction medium.

Table 7. Relative activity of β -mannanase produced by solid-state fermentation using 5.5 g of a mixture of cocoa bean shell, Ora-pro-nobis, and tamarind peel with *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in the presence of different organic solvents. The activity of the crude enzymatic extract without additives was considered 100% (control). Reaction conditions: solvent concentrations: 10, 20, 30, and 40%; temperature: 50 °C; reaction time: 5 min. Experiments were performed in triplicate, and values are presented as mean $\pm$ standard deviation.

		Relative activity (%)			
Solvent	Log P	Concentration (%)			
		10	20	30	40
Control	-	100	100	100	100
Dichloromethane	1.5	90.74 $\pm$ 0.001	102.20 $\pm$ 0.004	105.51 $\pm$ 0.005	118.96 $\pm$ 0.014

Acetone	-0.24	139.24 ± 0.005	145.41 ± 0.003	169.89 ± 0.008	177.16 ± 0.000
Hexane	3.98	93.83 ± 0.004	97.57 ± 0.006	98.90 ± 0.003	101.10 ± 0.012
Methanol	-0.77	85.89 ± 0.003	81.92 ± 0.000	81.04 ± 0.001	83.47 ± 0.004
Ethyl ether	0.89	86.55 ± 0.001	85.45 ± 0.000	93.17 ± 0.008	104.63 ± 0.002
DMF	-1.01	88.32 ± 0.002	91.84 ± 0.006	86.11 ± 0.004	79.72 ± 0.001
DMSO	-1.35	90.08 ± 0.007	86.77 ± 0.001	85.01 ± 0.002	80.16 ± 0.005
Ethyl alcohol	-0.24	100.44 ± 0.001	99.56 ± 0.001	100.88 ± 0.000	92.95 ± 0.002

DMF- N- dimethylformamide ; DMSO- imethyl sulfoxide.

The data presented in Table 7 demonstrate that the residual activity of the enzyme increased with the concentrations of dichloromethane (log P: 1.5), ethyl ether (log P: 0.89) and hexane (log P: 3.98) in the reaction medium. These data indicate that solvents with hydrophobic characteristics led to the maintenance of β -mannanase activity. Hydrophobic solvents do not eliminate the hydration water surrounding the enzyme, which contributes to the maintenance of its catalytic function, stability and increased activity (Da Silva Nunes et al. 2020). Although acetone (log P: -0.24) has a slightly polar nature, it was able to increase up to 37.87% in enzymatic activity at a concentration of 40% (v/v), which highlights a certain adaptability of the enzyme to solvents with different polarity characteristics.

On the other hand, the β -mannanase activity of *P. roqueforti* ATCC 10110 was gradually reduced in the presence of DMSO (log P: -1.35), DMF (log P: -1.01), methanol (log P: -0.77) and ethyl alcohol (log P: -0.24) solvents (Table 7). Hydrophilic solvents can eliminate the hydration water around the enzyme, which causes its denaturation and, consequently, decreases its activity (Da Silva Nunes et al. 2020).

Additionally, it was reported that acetone showed no inhibitory effect on β -mannanase from *Pyrenophora phalocomes* (Rastogi et al. 2016). It was found that acetone at a concentration of 1.25% reduced the β -mannanase activity of *P. citrinum* produced under SSF to 19.7%. On the other hand, hexane, methanol and 5% acetone increased the residual β -mannanase activity of *Aspergillus oryzae* MTCC 1846 to 120,118 and 113%, respectively (Jana et al. 2018). In contrast, a gradual

decline in the activity of purified β -mannanase from *Lactobacillus casei* HDS-01 was observed as the concentrations of acetone, methanol, ethanol, and DMSO increased (Zhao et al. 2020).

Regardless of the solvent analyzed, the highest concentration (40% v/v) kept the enzyme stable at up to 79.72% (Table 7). Some variations in the data can be justified by the fact that it is an unpurified enzymatic extract, which may contain impurities that influence the results (Zhao et al. 2020).

The tolerance to organic solvents observed for the enzyme is a relevant feature for industrial applications in non-aqueous media, since enzymes with this property can act efficiently without requiring additional stabilization modifications. Moreover, such tolerance may be advantageous in detergent formulations, which often contain organic solvents or surfactants, where enzymatic stability is essential to maintain cleaning efficiency (Doukyu & Ogino, 2010).

3.3.5. Halotolerance

The effect of adding NaCl at different concentrations on β -mannanase activity is shown in Table 8.

Table 8. Relative activity of β -mannanase produced by solid-state fermentation using 5.5 g of a mixture of cocoa bean shell, Ora-pro-nobis, and tamarind peel with *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in the presence of different NaCl concentrations. The activity of the crude enzymatic extract without additives was considered 100% (control). Reaction conditions: NaCl concentrations: 0.01, 0.05, 1, 2, 3, 4, 5, and 6 M; temperature: 50 °C; reaction time: 5 min. Experiments were performed in triplicate, and values are presented as mean $\pm$ standard deviation.

Concentration (M)	Relative activity (%)
Control	100
0.01	100.35 $\pm$ 0.002
0.05	107.74 $\pm$ 0.000
1	92.79 $\pm$ 0.001
2	107.74 $\pm$ 0.004
3	118.11 $\pm$ 0.005
4	105.80 $\pm$ 0.002
5	93.14 $\pm$ 0.007
6	101.58 $\pm$ 0.002

The enzyme remained active over a wide range of NaCl concentrations (0.01, 0.05, 1, 2, 3, 4, 5, and 6 M). There was a maximum increase of up to 18% in enzyme activity compared to the control (absence of NaCl). The highest saline concentration used (6 M) retained residual activity greater than 100%, as shown in Table 8. The data indicate that β -mannanase from *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 demonstrated to be tolerant to high salinity concentrations, even higher than the concentration of seawater, which is 0.46 mol L⁻¹ (Silva et al. 2018). Thus, halotolerant β -mannanase can be applied in processes using seawater instead of freshwater, such as the saccharification of lignocellulosic biomass or in pretreatment processes that require high salinity conditions (Silva et al. 2018), contributing to cost reduction and freshwater preservation (De Carvalho et al. 2023). Furthermore, it can be used in pulp biobleaching (Lima et al. 2021), marine aquaculture and wastewater treatment (Djelid et al. 2023) where NaCl concentrations can be high.

The halotolerance of a purified β -mannanase from *Bacillus halodurans* PPKS-2 was investigated and retained up to 80% of the activity using a concentration of 14% NaCl (Vijayalaxmi et al. 2013), while the purified β -mannanase from an *Enterobacter* sp. N18 was tolerant to the presence of salt, retaining more than 70% of the activity at a concentration of 0.5-4.0 M NaCl (You et al. 2016). The purified β -mannanase from *Bacillus velezensis* H1 subjected to a saline concentration of 0-4.0 M demonstrated that with increasing concentrations there was a continuous increase in enzymatic activity, approximately twice as high (200%) in the presence of 4 M, compared to the 0 M concentration (100%) (Djelid et al. 2023).

The halotolerance of purified β -mannanases from different sources has been demonstrated in previous studies. However, the β -mannanase from *P. roqueforti* investigated in this study, derived from a crude enzymatic extract, presents significant advantages. The absence of purification steps not only preserves enzymatic efficiency but also simplifies the process, reducing the number of steps and operational costs. These characteristics make β -mannanase from *P. roqueforti* a more efficient and economical option for industrial applications, without compromising its efficacy.

High salt concentrations inhibit or inactivate most enzymes by restricting the water molecules available for enzymatic hydration. Ions also disrupt hydration shells in hydrophobic regions, affecting electrostatic interactions. This results in damage to the structure, function, solubility, and stability of enzymes (Carli et al. 2016). On the other hand, halotolerant enzymes have a surface abundant in acidic residues and a low presence of hydrophobic residues. Acidic residues establish interactions with water molecules through their carboxyl groups, resulting in the formation of a solvation shell (Qeshmi et al. 2020), facilitating molecular hydration (Carli et al. 2016).

This research represents a major breakthrough in the lack of studies on the halotolerance of fungal β -mannanases in scientific knowledge, since no previous reports on the saline effects on the enzyme activity were found. Research in this area can optimize fungal β -mannanases for more efficient applications in challenging saline conditions. Exploring this gap is essential to develop sustainable and cost-effective solutions, aligned with increasing environmental demands in the biotechnology industry.

3.4. Saccharification

Enzymatic hydrolysis plays a crucial role in lignocellulose processing, being essential to produce bioproducts and bioenergy (Bernardi et al. 2021). Fig. 5 shows the release curve of total reducing sugars during the CS saccharification process using the enzyme β -mannanase from *Penicillium roqueforti* ATCC 10110.

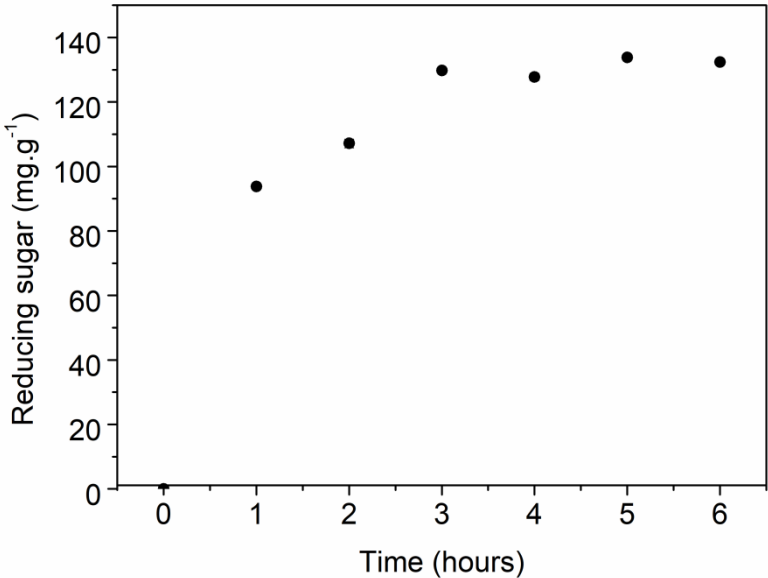


Fig. 5 Evaluation of corn straw saccharification using β -mannanase produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 under solid-state fermentation

The data demonstrates the susceptibility of CS to enzymatic hydrolysis, possibly due to the high concentration of hemicellulose present in the residue (de Almeida Antunes Ferraz et al. 2018), representing approximately 55.33% of the CS composition, as detailed in Table 1. Another factor that may have contributed to this result is the use of an unpurified enzymatic blend, in which several enzymes are present that act in synergy and may have contributed to the efficiency of the saccharification process (De Carvalho et al. 2023). Studies have highlighted that the combined

presence of enzymatic activities, as in cocktails containing β -mannanase, xylanase, and cellulase, significantly enhances the release of reducing sugars. For example, in pretreated rice straw, the yield increased from 18.5 mg/mL using isolated β -mannanase to 30.1 mg/mL when the enzyme cocktail was applied (Sahu et al. 2025).

In general, the enzymatic hydrolysis of CS at 50 °C and pH 6 resulted in a total concentration of reducing sugars ranging from 0.93 to 133.79 mg/g. There was a sharp increase in the reducing sugar content in the initial hours, with rates of 93.81, 107.14 and 129.72 mg/g in 1, 2 and 3 hours, respectively. After this period, a slight variation was noted until 6 hours of hydrolysis. The highest sugar production occurred at the end of 5 hours, reaching a maximum yield of 133.29 mg/g (Fig. 5).

After the application of crude β -mannanase from *Clonostachys byssicola* in the saccharification of pretreated sugarcane bagasse and soybean hulls, it was observed that the amount of reducing sugars obtained was lower than 1.5 mg/mL, with no significant variations over the 96 hours of saccharification (Costa et al. 2023). In another study, a consortium of crude cellulase-hemicellulase enzymes produced by *Aspergillus niger* P-1 was applied in the saccharification of pretreated rice straw, resulting in the release of 700 mg/g of reducing sugars after 120 hours of hydrolysis at 50 °C (Kaur et al. 2020). Furthermore, the application of the crude enzyme solution, containing β -mannanase from *Penicillium chrysogenum* QML-2, in the saccharification of pretreated corn cob powder, resulted in 553.94 mg/g of reducing sugars in 24 hours at 50 °C (Zhang and Sang 2015). In a related study, commercial β -mannanase was used for the saccharification of palm kernel cake at pH 4.5 and 45 °C for 72 hours, yielding 71.54 g/L of reducing sugars (Shukor et al. 2016).

In contrast to previous studies that often use additives to optimize enzymatic hydrolysis, this work highlights the feasibility of a simpler and more sustainable process, without the addition of auxiliary chemicals. The β -mannanase produced showed high activity, efficiently converting corn stover into reducing sugars (133.29 mg/g) in only 6 hours of reaction. The absence of additives did not compromise the efficiency of the process, demonstrating the potential of β -mannanase for the conversion of lignocellulosic biomass into fermentable sugars. The results surpassed those of studies that used pretreatments and longer reaction times. Thus, the adopted approach offers a more economical and environmentally friendly alternative for the production of biofuels and bioproducts from lignocellulosic biomass. However, the use of pretreatment may be a strategy to be explored in future research, with the aim of enhancing process efficiency and increasing the yield of reducing sugars, which may benefit ethanol production.

3.4.1. Scanning electron microscopy

SEM was used to evaluate the main microstructural modifications that occurred in the morphology of hydrolyzed corn straw (Fig. 6).

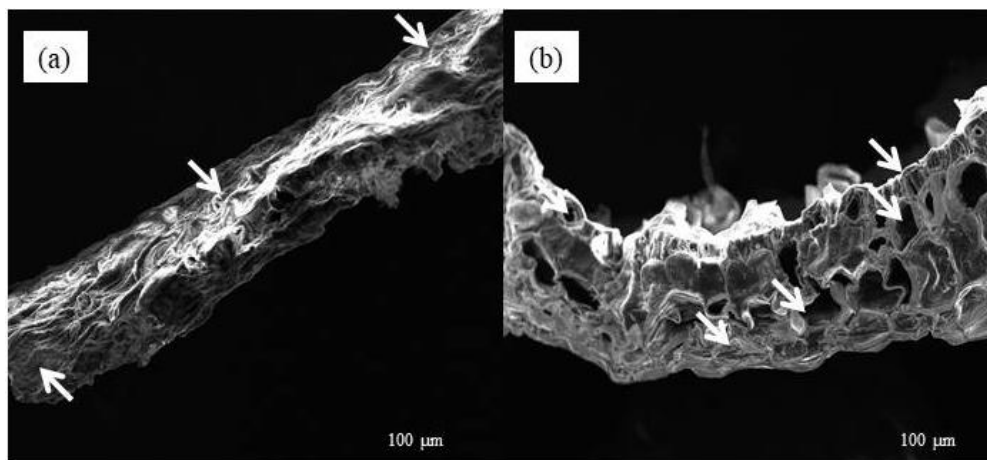


Fig. 6 Scanning electron microscopy (SEM) analysis of corn straw after the saccharification process. **a)** Control; **b)** Residue after saccharification with enzymatic *blend*

Corn straw without the addition of the enzyme *blend* (control) was characterized by a flat surface, with small cracks and a more intact structure, as illustrated in Fig. 6a. In contrast, enzymatic hydrolysis of corn straw resulted in a rough and irregular surface, with the presence of pores, demonstrating that the enzyme caused damage to the surface structure of the corn straw (Fig. 6b). This surface damage caused by the enzymatic action is beneficial for the saccharification process, since the change in the structure of lignocellulose facilitates the access of enzymes to the internal fibers, optimizing the release of sugars. This relationship is corroborated by the increase in sugar yield observed after enzymatic hydrolysis (Fig. 5) and described in the literature as a determining factor for the efficiency of the process (Ziaei-Rad et al. 2021).

3.4.2. Fourier Transform Infrared Spectroscopy –FTIR

FTIR spectral analysis provided detailed insights into the chemical alterations occurring in corn straw after treatment with a crude enzymatic extract derived from the solid-state fermentation of a mixture of tamarind shell, ora-pro-nobis, and cocoa bean shell using *Penicillium roqueforti* ATCC 10110. This analysis is crucial for understanding how the crude enzymatic extract can be utilized as a saccharification agent for applications in baking and other industrial uses, based on its chemical composition.

The peak at 3338.18 cm^{-1} is characteristic of the stretching vibration of hydroxyl groups in polysaccharides, particularly cellulose. This peak also encompasses inter- and intra-molecular hydrogen bond vibrations within the cellulose structure, which are crucial in the formation and stability of its crystalline regions (Hospodarova et al. 2018). This peak was present in both the CH and SCH, indicating that the cellulose structure is preserved. However, a slight variation in peak intensity suggests minor modifications in the hydrogen bonding network, potentially induced by enzymatic action. Additionally, the peak at 1159.27 cm^{-1} , which lies within the broader $1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ region associated with elongations of C-O-C and C-O groups typical of carbohydrates, showed a slight change in transmittance in the SCH sample (Sampaio et al. 2021). This suggests subtle alterations in the cellulose structure, likely due to changes in the polysaccharide framework due to enzyme-induced modifications of functional groups.

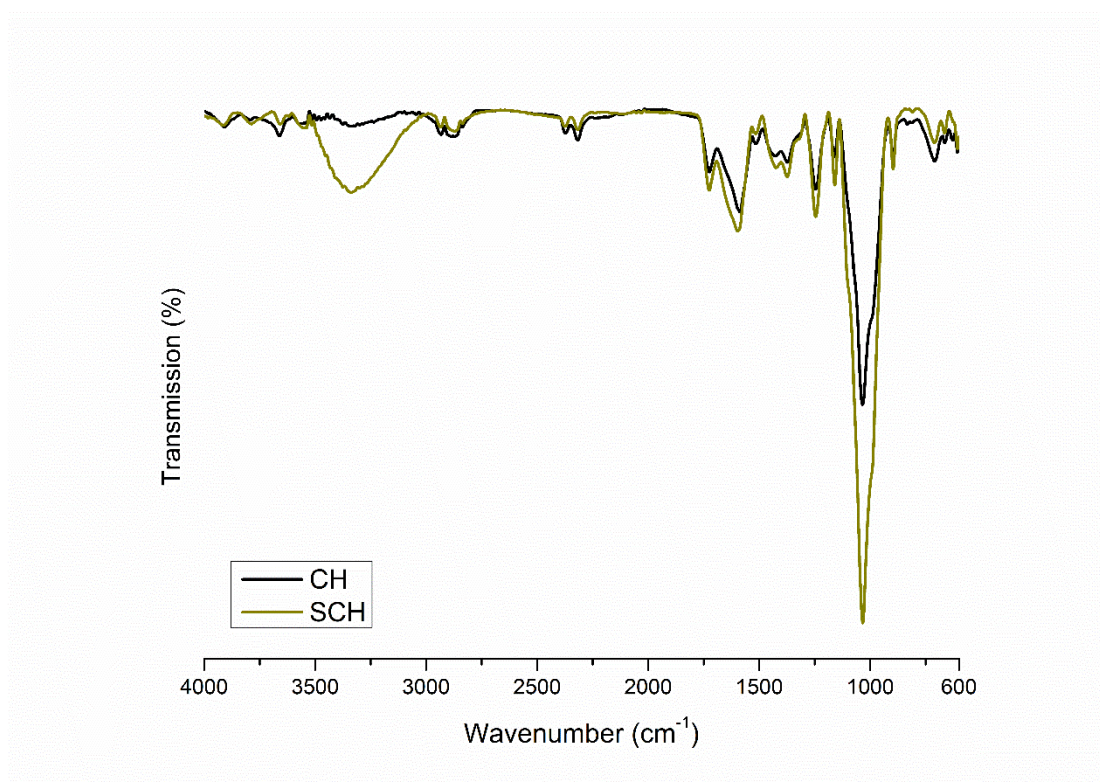


Fig. 7 FTIR spectrum of Raw Corn Husk (CH) and Saccharified Corn Husk (SCH)

Additionally, the peak at 1245.81 cm^{-1} , primarily corresponding to C-O stretching in hemicellulose, also involves PO_2^- stretching vibrations (Dos Santos Reis et al. 2024). The similar profiles observed in both the CH and SCH samples suggest that the basic structure of hemicellulose remains relatively intact post-treatment, with no significant spectral differences detected. Despite that, the peak at 1423.27 cm^{-1} , which represents C-H₂ deformation in cellulose, exhibited a slight

shift, indicating alterations in the cellulose structure, possibly due to depolymerization or modification of links during enzymatic treatment (Md Salim et al. 2021).

In the other hand, a peak at 1594.90 cm^{-1} is associated with aromatic ring vibrations in lignin (Pancholi et al. 2023). The slight variation in this peak suggests minor changes in the aromatic structure of lignin, indicating partial degradation or modifications in its functional groups due to the enzymatic treatment. Furthermore, the disappearance of the peak at 1725.09 cm^{-1} , related to C=O stretching in carbonyl groups, suggests a significant alteration in hemicellulose structure, potentially indicating degradation of these carbonyl groups (Pancholi et al. 2023).

Peaks at 3909.09 cm^{-1} and 3784.72 cm^{-1} , associated with O-H stretching vibrations, could indicate the presence of hydroxyl groups in water or proteins (Adeleye et al. 2022). The stability of these peaks suggests that the total hydroxyl content remains relatively unchanged, though there may be increased exposure of hydroxyl groups in the SCH due to enzymatic action. Additionally, peaks at 1373.09 cm^{-1} , 1245.81 cm^{-1} , and 1159.27 cm^{-1} may be related to nitrogenous compounds such as proteins, considering that the enzymatic extract was not completely rinsed off. This suggests a possible interaction with the biomass that could affect the FTIR spectrum (Wang et al. 2024).

Naturally occurring metabolites produced by *P. roqueforti*, including dark blue green fungal pigments confirmed by the dark pigmentation in the corn straw, likely impacted the optical properties of the sample, resulting in decreased transmittance observed in the FTIR spectrum (Cleere et al. 2024). This effect could contribute to the alteration in transmittance intensity noted at 3909.09 cm^{-1} and 1373.09 cm^{-1} .

The appearance of an additional peak at 3784.72 cm^{-1} post-saccharification and the disappearance of the peak at 1725.09 cm^{-1} suggest modifications in cellulose and hemicellulose structures, respectively (Adeleye et al. 2022). These changes may indicate increased availability of fermentable compounds following the saccharification process, which is crucial for subsequent industrial applications. The reduction in transmittance at 1594.90 cm^{-1} , associated with the vibration of the aromatic ring in lignin, suggests partial lignin degradation and the possible formation of new chemical radicals, reinforcing the effectiveness of the enzymatic treatment (Zhang et al. 2023).

The enzymatic treatment with the crude extract has induced significant changes in cellulose, hemicellulose, and lignin in corn husk, facilitating the release of functional groups and exposure of active sites in the biomass. These results highlight the potential of the enzymatic extract for modifying lignocellulosic biomass, especially for saccharification processes and related industrial applications (Ratna et al. 2022).

4. Conclusion

In this study, we demonstrated the potential of β -mannanase produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in biotechnological applications. The optimization of the fermentation process, using agro-industrial waste as substrates, resulted in efficient enzyme production (104.27 U/g). β -mannanase demonstrated to be very stable over a wide range of pH and temperature, in addition to being tolerant to solvents and salts. Its effectiveness in the hydrolysis of corn stover, generating 133.29 mg/g of reducing sugars in 5 hours, confirms its potential in the conversion of lignocellulosic biomass. The sustainable production of the enzyme, without the need for inducers, highlights its applicability in sectors such as biofuels and valorization of agro-industrial waste. Although the results are promising, challenges such as the optimization of large-scale production and the stability of the enzyme under industrial conditions still need to be overcome. Overcoming these challenges can accelerate the development of more efficient and sustainable biotechnological processes, promoting a circular economy less dependent on fossil resources.

Acknowledgments

The authors would like to express their gratitude to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for their financial support, the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB). The authors also thank the Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) for their administrative and technical assistance.

Funding

This work was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-88887.668221/2022-00), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB, Brazil).

Author contribution

Luise de Oliveira Sena: Conceptualization, Formal analysis and investigation, Writing - original draft preparation and Writing - review and editing- Fabiane Neves Silva: Formal analysis and investigation and Writing - review and editing- Igor Carvalho Fontes Sampaio: Writing - review and editing and Visualization- Grazielly de Jesus Silva: Writing - review and editing- João Marcos Sena Chaves: Formal analysis and investigation- Taise Amorim Ribeiro: Formal analysis and

investigation- Gabriel Lucas Silva de Jesus: Formal analysis and investigation- Isabela Viana Lopes de Moura: Writing - original draft preparation- Paulo Neilson Marques dos Anjos: Formal analysis and investigation- Floriatan Santos Costa: Formal analysis and investigation and Writing - original draft preparation- Muhammad Irfan: Writing - review and editing- Luiz Carlos Salay: Writing - review and editing- Marcelo Franco: Conceptualization, Writing - review and editing, Vizualization, Funding acquisition, Resources and Supervision.

Data availability

Data will be made available on request.

Ethical Approval

Not applicable.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- Adeleye OA, Bamiro OA, Albalawi DA, et al (2022) Characterizations of Alpha-Cellulose and Microcrystalline Cellulose Isolated from Cocoa Pod Husk as a Potential Pharmaceutical Excipient. *Materials* 15:5992. <https://doi.org/10.3390/ma15175992>
- Ahirwar S, Soni H, Rawat HK, et al (2016) Production optimization and functional characterization of thermostable β -mannanase from *Malbranchea cinnamomea* NFCCI 3724 and its applicability in mannotetraose (M4) generation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 63:344–353. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.03.033>
- Almeida Lessa O, Neves Silva F, Tavares IMDC, et al (2023) Structural alteration of cocoa bean shell fibers through biological treatment using *Penicillium roqueforti*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 53:1154–1163. <https://doi.org/10.1080/10826068.2023.2177866>
- Alzagameem A, Klein SE, Bergs M, et al (2019) Antimicrobial Activity of Lignin and Lignin-Derived Cellulose and Chitosan Composites against Selected Pathogenic and Spoilage Microorganisms. *Polymers* 11:670. <https://doi.org/10.3390/polym11040670>
- Arpit Singh T, Sharma M, Sharma M, et al (2022) Valorization of agro-industrial residues for production of commercial biorefinery products. *Fuel* 322:124284. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.124284>
- Bangoria P, Divecha J, Shah AR (2021) Production of mannooligosaccharides producing β -Mannanase by newly isolated *Penicillium aculeatum* APS1 using oil seed residues under solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 34:102023. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102023>
- Bernardi AV, Gerolamo LE, Uyemura SA, Dinamarco TM (2021) A thermophilic, pH-tolerant, and highly active GH10 xylanase from *Aspergillus fumigatus* boosted pre-treated sugarcane bagasse saccharification by cellulases. *Industrial Crops and Products* 170:113697. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113697>
- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, et al (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76:965–977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- Bhaturiwalla R, Bagban M, Mansuri A, Modi H (2022) Successive approach of medium optimization using one-factor-at-a-time and response surface methodology for improved β -mannanase production from *Streptomyces* sp. *Bioresource Technology Reports* 18:101087. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101087>
- Caldas JV, Vignale K, Boonsinchai N, et al (2018) The effect of β -mannanase on nutrient utilization and blood parameters in chicks fed diets containing soybean meal and guar gum. *Poultry Science* 97:2807–2817. <https://doi.org/10.3382/ps/pey099>
- Carli S, Meleiro LP, Rosa JC, et al (2016) A novel thermostable and halotolerant xylanase from *Colletotrichum graminicola*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 133:S508–S517. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2017.05.002>

- Chauhan PS, Sharma P, Puri N, Gupta N (2014) A process for reduction in viscosity of coffee extract by enzymatic hydrolysis of mannan. *Bioprocess Biosyst Eng* 37:1459–1467. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1118-9>
- Chen S, Huo Y, Tang S, Lin Y, Zheng S (2025) Molecular modification and preliminary application of a novel mannanase from *Alkalihalobacillus hemicellulosilyticus*. *International Journal of Biological Macromolecules* 310:143041. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.143041>
- Chilakamarry CR, Mimi Sakinah AM, Zularisam AW, et al (2022) Advances in solid-state fermentation for bioconversion of agricultural wastes to value-added products: Opportunities and challenges. *Bioresource Technology* 343:126065. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126065>
- Cleere MM, Novodvorska M, Geib E, et al (2024) New colours for old in the blue-cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *npj Sci Food* 8:. <https://doi.org/10.1038/s41538-023-00244-9>
- Costa DAL, Williams TCR, Do Vale LHF, Filho EXF (2023) Characterization of mannanases from *Clonostachys byssicola* involved in the breakdown of lignocellulosic substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 50:102680. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102680>
- Da Silva Nunes N, Carneiro LL, De Menezes LHS, et al (2020) Simplex-Centroid Design and Artificial Neural Network-Genetic Algorithm for the Optimization of Exoglucanase Production by *Penicillium Roqueforti* ATCC 10110 Through Solid-State Fermentation Using a Blend of Agroindustrial Wastes. *Bioenerg Res* 13:1130–1143. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10157-0>
- Dawood A, Ma K (2020) Applications of Microbial β -Mannanases. *Front Bioeng Biotechnol* 8:. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.598630>
- De Almeida Antunes Ferraz JL, Oliveira Souza L, Gustavo De Araújo Fernandes A, et al (2020) Optimization of the solid-state fermentation conditions and characterization of xylanase produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 using yellow mombin residue (*Spondias mombin* L.). *Chemical Engineering Communications* 207:31–42. <https://doi.org/10.1080/00986445.2019.1572000>
- de Almeida Antunes Ferraz JL, Souza LO, Soares GA, et al (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>
- De Brito AR, Santos Reis ND, Silva TP, et al (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 & Biotechnology* 47:977–985. <https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1365247>
- De Carvalho MS, De Menezes LHS, Pimentel AB, et al (2023) Application of Chemometric Methods for the Optimization Secretion of Xylanase by *Aspergillus oryzae* in Solid State Fermentation and Its Application in the Saccharification of Agro-industrial Waste. *Waste Biomass Valor* 14:3183–3193. <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01832-8>

- De Menezes LHS, Pimentel AB, Oliveira PC, et al (2023) The Application of Chemometric Methods in the Production of Enzymes Through Solid State Fermentation Uses the Artificial Neural Network—a Review. *Bioenerg Res* 16:279–288. <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10462-w>
- Djelid H, Flahaut S, Oudjama Y, et al (2023) High NaCl concentrations induce the resistance to thermal denaturation of an extremely halotolerant (salt-activated) β -mannanase from *Bacillus velezensis* H1. *World J Microbiol Biotechnol* 39:. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03754-6>
- Dos Santos Reis N, Sampaio ICF, Oliveira PC, et al (2024) Enhancing circular economy: eco-friendly starch extraction and modification using fungal crude enzymatic extract from cocoa shell waste. *Biomass Conv Bioref*. <https://doi.org/10.1007/s13399-024-05849-y>
- Doukyu N, Ogino H (2010) Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal* 48:270–282. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.09.009>
- Falkoski DL, Guimarães VM, De Almeida MN, et al (2013) *Chrysosporthe cubensis*: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. *Bioresource Technology* 130:296–305. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.140>
- G. Novaes C, T. Yamaki R, F. De Paula V, et al (2018) Optimization of Analytical Methods Using Response Surface Methodology - Part II: Mixture Variables. *Rev Virtual Quim* 393–420. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180030>
- Garcia Diaz T, Ferriani Branco A, Jacovaci FA, et al (2018) Use of live yeast and mannan-oligosaccharides in grain-based diets for cattle: Ruminant parameters, nutrient digestibility, and inflammatory response. *PLoS ONE* 13:e0207127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207127>
- Hospodarova V, Singovszka E, Stevulova N (2018) Characterization of Cellulosic Fibers by FTIR Spectroscopy for Their Further Implementation to Building Materials. *AJAC* 09:303–310. <https://doi.org/10.4236/ajac.2018.96023>
- Ismail SA, Hassan AA, Emran MA (2019) Economic production of thermo-active endo β -mannanase for the removal of food stain and production of antioxidant manno-oligosaccharides. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 22:101387. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101387>
- Jana UK, Suryawanshi RK, Prajapati BP, et al (2018) Production optimization and characterization of manno-oligosaccharide generating β -mannanase from *Aspergillus oryzae*. *Bioresource Technology* 268:308–314. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.143>
- Karahalil E, Germec M, Karaoglan M, et al (2020) Partial purification and characterization of a recombinant β -mannanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Aspergillus sojae* grown on carob extract. *Biomass Conv Bioref* 10:1189–1205. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00487-1>
- Kaur J, Chugh P, Soni R, Soni SK (2020) A low-cost approach for the generation of enhanced sugars and ethanol from rice straw using in-house produced cellulase-hemicellulase consortium from *A. niger* P-19. *Bioresource Technology Reports* 11:100469. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100469>

- Kumar A, Sharma KK, Kumar P, Ramchiary N (2015a) Laccase isozymes from *Ganoderma lucidum* MDU-7: Isolation, characterization, catalytic properties and differential role during oxidative stress. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 113:68–75. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.01.010>
- Kumar D, Datt C, Das LK, Kundu SS (2015b) Evaluation of various feedstuffs of ruminants in terms of chemical composition and metabolisable energy content. *Vet World* 8:605–609. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.605-609>
- Kumar Suryawanshi R, Kango N (2021) Production of mannoooligosaccharides from various mannans and evaluation of their prebiotic potential. *Food Chemistry* 334:127428. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127428>
- Leite P, Sousa D, Fernandes H, et al (2021) Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 27:100407. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.100407>
- Lima AC, Silva D, Silva V, et al (2021) B-MANNANASE production by *Penicillium citrinum* through SOLID-STATE fermentation using açai residual biomass (*EUTERPE OLERACEA*). *J of Chemical Tech & Biotech* 96:2744–2754. <https://doi.org/10.1002/jctb.6818>
- Liu Z, Ning C, Yuan M, et al (2020) High-level expression of a thermophilic and acidophilic β -mannanase from *Aspergillus kawachii* IFO 4308 with significant potential in mannoooligosaccharide preparation. *Bioresource Technology* 295:122257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122257>
- Malgas S, Van Dyk SJ, Pletschke BI (2015) β -Mannanase (Man26A) and α -galactosidase (Aga27A) synergism – A key factor for the hydrolysis of galactomannan substrates. *Enzyme and Microbial Technology* 70:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.007>
- Md Salim R, Asik J, Sarjadi MS (2021) Chemical functional groups of extractives, cellulose and lignin extracted from native *Leucaena leucocephala* bark. *Wood Sci Technol* 55:295–313. <https://doi.org/10.1007/s00226-020-01258-2>
- Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem* 31:426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Nogueira Soares Souza F, Rocha Vieira S, Leopoldina Lamounier Campidelli M, et al (2022) Impact of using cocoa bean shell powder as a substitute for wheat flour on some of chocolate cake properties. *Food Chemistry* 381:132215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132215>
- Ohara A, Soares De Castro RJ, Goia Nishide T, et al (2015) Invertase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation: Focus on physical–chemical parameters, synergistic and antagonistic effects using agro-industrial wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 4:645–652. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.06.008>
- Oliveira PC, State University of Southwest Bahia, de-Brito AR, et al (2018) Cocoa shell for the production of endoglucanase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid state fermentation and biochemical properties. *RevMexIngQuim* 18:777–787. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n3/oliveira>

- Pancholi MJ, Khristi A, M. AK, Bagchi D (2023) Comparative Analysis of Lignocellulose Agricultural Waste and Pre-treatment Conditions with FTIR and Machine Learning Modeling. *Bioenerg Res* 16:123–137. <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10444-y>
- Patel K, Dudhagara P (2020) Compatibility testing and enhancing the pulp bleaching process by hydrolases of the newly isolated thermophilic *Isoptericola variabilis* strain UD-6. *Biocatalysis and Biotransformation* 38:144–160. <https://doi.org/10.1080/10242422.2019.1711067>
- Purohit A, Yadav SK (2020) Characterization of a thermotolerant and acidophilic mannanase producing *Microbacterium* sp. CIAB417 for mannooligosachharide production from agro-residues and dye decolorization. *International Journal of Biological Macromolecules* 163:1154–1161. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.114>
- Qeshmi FI, Homaei A, Fernandes P, et al (2020) Xylanases from marine microorganisms: A brief overview on scope, sources, features and potential applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1868:140312. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140312>
- Rastogi S, Soni R, Kaur J, Soni SK (2016) Unravelling the capability of *Pyrenophora phaeocomes* S-1 for the production of ligno-hemicellulolytic enzyme cocktail and simultaneous bio-delignification of rice straw for enhanced enzymatic saccharification. *Bioresource Technology* 222:458–469. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.012>
- Ratna AS, Ghosh A, Mukhopadhyay S (2022) Advances and prospects of corn husk as a sustainable material in composites and other technical applications. *Journal of Cleaner Production* 371:133563. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133563>
- Sadh PK, Duhan S, Duhan JS (2018) Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresour Bioprocess* 5:. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>
- Sahu S, Bansal U, Singh G, Arya SK (2025) Comparison of physical, chemical, physico-chemical, and enzymatic pretreatment of paddy straw for ethanol production. *Sustainable Chemistry for the Environment* 10:100239. <https://doi.org/10.1016/j.scenv.2025.100239>
- Saleh SAA, Mostafa FA, Ahmed SA, et al (2024) Date nawah powder as a promising waste for β -mannanase production from a new isolate *Aspergillus niger* MSSFW, statistically improving production and enzymatic characterization. *International Journal of Biological Macromolecules* 277:134447. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134447>
- Sales De Menezes LH, Carneiro LL, Maria De Carvalho Tavares I, et al (2021) Artificial neural network hybridized with a genetic algorithm for optimization of lipase production from *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid-state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 31:101885. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101885>
- Sampaio ICF, Crugeira PJJ, De Azevedo Santos Ferreira J, et al (2021) Surfactant/Alkali Stress Effect in Exopolysaccharide Production by *Xanthomonas* and *Enterobacter* Strains. In: La Porta FA, Taft CA (eds) *Functional Properties of Advanced Engineering Materials and Biomolecules*. Springer International Publishing, Cham, pp 695–717

Shukor H, Abdesahian P, Al-Shorgani NKN, et al (2016) Enhanced mannan-derived fermentable sugars of palm kernel cake by mannanase-catalyzed hydrolysis for production of biobutanol. *Bioresource Technology* 218:257–264. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.084>

Silva GR, Capetti CC de M, Dabul ANG, Liberato MV, Curvelo AA da S, Pellegrini VR, Polikarpov I (2025) Recombinant GH5_8 mannanase from *Hungateiclostridium cellulolyticum*: biochemical and structural characteristics and applications for mannoooligosaccharides production from spent coffee grounds. *Food Bioprod Process* 151:44–53. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2025.02.014>

Silva TP, De Albuquerque FS, Dos Santos CWV, et al (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>

Soni H, Ganaie MohdA, Pranaw K, Kango N (2015) Design-of-experiment strategy for the production of mannanase biocatalysts using palm kernel cake and its application to degrade locust bean and guar gum. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 4:229–234. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.01.001>

Sosa-Martínez JD, Montañez J, Contreras-Esquivel JC, et al (2023) Agroindustrial and food processing residues valorization for solid-state fermentation processes: A case for optimizing the co-production of hydrolytic enzymes. *Journal of Environmental Management* 347:119067. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119067>

Souza LO, De Brito AR, Bonomo RCF, et al (2018) Comparison of the biochemical properties between the xylanases of *Thermomyces lanuginosus* (Sigma®) and excreted by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 during the solid state fermentation of sugarcane bagasse. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 16:277–284. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.08.016>

Srivastava PK, Kapoor M (2017) Production, properties, and applications of endo- β -mannanases. *Biotechnology Advances* 35:1–19. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.001>

Vijayalaxmi S, Prakash P, Jayalakshmi SK, et al (2013) Production of Extremely Alkaliphilic, Halotolerant, Detergent, and Thermostable Mannanase by the Free and Immobilized Cells of *Bacillus halodurans* PPKS-2. Purification and Characterization. *Appl Biochem Biotechnol* 171:382–395. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0333-9>

Wang N, Li Y, Sun D, Miao M, Jiang Z (2024) A novel β -mannanase from *Stachybotrys chlorohalonata* for production of fenugreek manno-oligosaccharides. *Food Bioscience* 63:105539. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105539>

Wang T, Wu H-X, Li W, et al (2022) Effects of dietary mannan oligosaccharides (MOS) supplementation on metabolism, inflammatory response and gut microbiota of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with high carbohydrate diet. *Fish & Shellfish Immunology* 130:550–559. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.09.052>

- Wang Y, Zhang Y, Cui Q, et al (2024) Composition of Lignocellulose Hydrolysate in Different Biorefinery Strategies: Nutrients and Inhibitors. *Molecules* 29:2275. <https://doi.org/10.3390/molecules29102275>
- Wongsiridetchai C, Jonjaroen V, Sawangwan T, et al (2021) Evaluation of prebiotic manno oligosaccharides obtained from spent coffee grounds for nutraceutical application. *LWT* 148:111717. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111717>
- Xie J, Pan L, He Z, et al (2020) A novel thermophilic β -mannanase with broad-range pH stability from *Lichtheimia ramosa* and its synergistic effect with α -galactosidase on hydrolyzing palm kernel meal. *Process Biochemistry* 88:51–59. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.09.029>
- Yan S, Shi R, Li L, et al (2019) Mannan Oligosaccharide Suppresses Lipid Accumulation and Appetite in Western-Diet-Induced Obese Mice Via Reshaping Gut Microbiome and Enhancing Short-Chain Fatty Acids Production. *Molecular Nutrition Food Res* 63:. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900521>
- You J, Liu J-F, Yang S-Z, Mu B-Z (2016) Low-temperature-active and salt-tolerant β -mannanase from a newly isolated *Enterobacter* sp. strain N18. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 121:140–146. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.06.001>
- Zhang H, Sang Q (2015) Production and extraction optimization of xylanase and β -mannanase by *Penicillium chrysogenum* QML-2 and primary application in saccharification of corn cob. *Biochemical Engineering Journal* 97:101–110. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.02.014>
- Zhang M, Tian R, Tang S, et al (2023) The structure and properties of lignin isolated from various lignocellulosic biomass by different treatment processes. *International Journal of Biological Macromolecules* 243:125219. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125219>
- Zhang W, Yu X, Xin L, Xu S (2025) Production of *Aspergillus niger* cellulase using defatted rice bran and its use in lignocellulosic saccharification reaction. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 13:115003. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.115003>
- Zhao D, Zhang X, Wang Y, et al (2020) Purification, biochemical and secondary structural characterisation of β -mannanase from *Lactobacillus casei* HDS-01 and juice clarification potential. *International Journal of Biological Macromolecules* 154:826–834. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.157>
- Zhao H (2020) What do we learn from enzyme behaviors in organic solvents? – Structural functionalization of ionic liquids for enzyme activation and stabilization. *Biotechnology Advances* 45:107638. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107638>
- Zhou C, Xue Y, Ma Y (2018) Characterization and high-efficiency secreted expression in *Bacillus subtilis* of a thermo-alkaline β -mannanase from an alkaliphilic *Bacillus clausii* strain S10. *Microb Cell Fact* 17:. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0973-0>
- Ziaei-Rad Z, Fooladi J, Pazouki M, Gummadi SN (2021) Lignocellulosic biomass pre-treatment using low-cost ionic liquid for bioethanol production: An economically viable method for wheat

straw fractionation. *Biomass and Bioenergy* 151:106140.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106140>

CAPÍTULO IV

***ARTIGO: Melhoria dos atributos de qualidade de pão sem glúten à base de farinha de banana verde por meio da aplicação de um extrato bruto multienzimático**

Melhoria dos atributos de qualidade de pão sem glúten à base de farinha de banana verde por meio da aplicação de um extrato bruto multienzimático

Luise de Oliveira Sena^a, Eliseth de Souza Viana^b, Fabiane Neves Silva^c, Alisson Santos da Silva Quinto^d, Jaciene Lopes de Jesus^b, Renato Souza Cruz^e, Raildo Alves Fiuza Junior^f, Marcelo Franco^{g*}

^a*Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Departamentos de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga 45700-000, Brasil*

^b*Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia, 44380-000, Brasil*

^c*Centro de Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano, Campus Uruçuca, Bahia, 45680-000, Brasil*

^d*Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 40110-100, Brasil*

^e*Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, 44036-900, Brasil*

^f*Laboratório de Catálise e Materiais, Departamento de Química Geral e Inorgânica, Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, Salvador, Bahia, 40170-280, Brasil*

^g*Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 45654-370, Brasil*

*Auto correspondente: Marcelo Franco

Telefone = +55 073 3231 4158; Fax = +55 073 3680 5355;

e-mail = mfranco@uesc.br

Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar o impacto da aplicação de um extrato bruto multienzimático (EBM), obtido via fermentação em estado sólido, utilizando uma mistura de resíduos agroindustriais (casca da amêndoa de cacau e casca de tamarindo) e ora-pro-nóbis, por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110, sobre a qualidade nutricional, tecnológica e sensorial de pães sem glúten produzidos com farinha de banana verde (FBV) (cultivar BRS Terra Anã). Para isso, foram desenvolvidas quatro formulações: F1 (FBV + água), F2 (FBV + EBM), F3 (FBV + água + 6% de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)) e F4 (FBV + EBM + 6% de HPMC). A atividade enzimática do EBM foi determinada e os pães foram caracterizados quanto às propriedades físicas, cor, composição centesimal e aceitação sensorial, incluindo escala do ideal e intenção de compra, com análise estatística por ANOVA seguida do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). O EBM apresentou perfil multienzimático, com predominância de β -mananase ($104,27 \text{ Ug}^{-1}$), além de celulase, protease, lacase, xilanase, manganês peroxidase e amilase. Embora o uso isolado do EBM não tenha promovido melhorias estruturais significativas, sua associação com a HPMC (F4) revelou um efeito sinérgico importante. A formulação F4 apresentou o melhor desempenho estrutural, com maior volume ($178,61 \text{ mL}$), volume específico ($2,56 \text{ mL/g}$) e menor densidade ($390,09 \text{ kg/m}^3$) ($p < 0,05$), além de um teor de umidade superior ($47,63\%$) em comparação ao controle. Observou-se um escurecimento desejável da crosta na F4 ($L^* 49,33$), com intensificação de tons dourados-amarronzados, assemelhando-se ao padrão de panificação convencional. A avaliação sensorial da aparência externa evidenciou que F4 (7,1) e F3 (6,3), apresentaram maior aceitação, com aprovação de $93,4\%$ e $83,6\%$, respectivamente. Após o consumo, a F4 consolidou-se como a formulação superior, alcançando as maiores médias para textura (7,2), cor (7,2) e aceitação global (7,0), com 90% de aprovação global. A textura e a cor da F4 foram consideradas ideais por 52 e 48% dos avaliadores, respectivamente. A intenção de compra refletiu essa preferência, com índices expressivos tanto na avaliação visual ($67,2\%$) quanto pós-consumo (35%). A composição centesimal das formulações não apresentou diferenças significativas para fibra, proteína, cinzas, carboidratos e valor calórico, observando-se apenas maior teor de umidade e lipídeos na formulação F4. Os resultados demonstram que o EBM, quando associado à HPMC, promove melhorias expressivas na estrutura e na qualidade sensorial de pães à base de FBV, resultando em maior volume, melhor estrutura, e maior aprovação sensorial. Dessa forma, a formulação F4 destacou-se como a mais promissora, consolidando-se como uma estratégia biotecnológica sustentável para o desenvolvimento de pães sem glúten com melhor qualidade e maior aceitabilidade pelo consumidor.

Palavras-chave: β -mananase; Fermentação em estado sólido, Resíduos agroindustriais, Panificação sem glúten; Aceitação sensorial.

1. Introdução

Nos últimos anos, a demanda por produtos isentos de glúten tem aumentado de forma expressiva, impulsionada pela necessidade clínica de exclusão dessa proteína por indivíduos com doença celíaca, uma enteropatia autoimune que afeta cerca de 1% da população mundial, além daqueles com alergia ao trigo ou sensibilidade ao glúten não celíaca (D'HEEDENE; VANUYTSEL; WAUTERS, 2024; LIU *et al.*, 2026; SHUSHARI *et al.*, 2025).

Este cenário se reflete em um mercado em ascensão, avaliado em aproximadamente US\$ 18,3 bilhões até 2033. Dentro deste panorama, a panificação consolida-se como o principal segmento em geração de receita, representando mais de 30% do setor (GRAND VIEW RESEARCH, 2026), com destaque para o mercado de pães sem glúten (PSG), estimado em cerca de US\$ 772 milhões em 2024 e com previsão de alcançar US\$ 1,09 bilhão até 2030 (GRAND VIEW RESEARCH, 2025). Contudo, apesar da expansão comercial e do crescente interesse do consumidor, a obtenção de pães sem glúten com qualidade tecnológica e sensorial satisfatória ainda representa um dos principais desafios da indústria panificadora.

A ausência do glúten impede a formação da rede viscoelástica tridimensional necessária para aprisionar os gases da fermentação (DI RENZO *et al.*, 2024). Como consequência, esses produtos apresentam limitações tecnológicas e sensoriais, incluindo menor expansão, redução do volume específico, miolo mais compacto e irregular, além de textura e sabor desagradáveis (VLAD *et al.*, 2025). Esses fatores evidenciam a necessidade de estratégias capazes de mimetizar, ao menos parcialmente, as funções estruturais desempenhadas pelo glúten na matriz panificável.

Para contornar essas limitações, diferentes abordagens têm sido empregadas, com destaque para o uso de hidrocolóides, como goma xantana (MENSAH *et al.*, 2026) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) (GUADALUPE-MOYANO *et al.*, 2022), que auxiliam na estabilização da matriz e na retenção de gases, além da aplicação de enzimas comerciais como ferramenta para modificar componentes da massa e melhorar as propriedades tecnológicas (SARABHAI; TAMILSELVAN; PRABHASANKAR, 2021; ZHAO *et al.*, 2022). Mais recentemente, a combinação dessas estratégias tem demonstrado potencial sinérgico, contribuindo para melhorias na textura, volume e estabilidade estrutural (CALLE; BENAVENT-GIL; ROSELL, 2020; GHODOSIPOOR *et al.*, 2025).

Apesar da eficácia das enzimas comerciais, seu elevado custo de aquisição constitui uma barreira econômica relevante, elevando o preço final do produto e limitando sua adoção industrial em larga escala (COSTA *et al.*, 2021). Em resposta a esse cenário, a biotecnologia tem direcionado esforços para a produção de enzimas microbianas a partir de matérias-primas de baixo custo

(SILVA *et al.*, 2025). Dessa forma, a fermentação em estado sólido (FES) surge como uma alternativa sustentável e de baixo investimento, permitindo a valorização de resíduos agroindustriais como substratos (DE OLIVEIRA SENA *et al.*, 2025).

Neste contexto, destaca-se a produção de um extrato bruto multienzimático (EBM) via FES como uma estratégia tecnológica. Diferente das enzimas isoladas, o EBM concentra múltiplas atividades enzimáticas que podem atuar de forma sinérgica sobre diversos polímeros da matriz panificável (DE CARVALHO *et al.*, 2023), o que pode propiciar melhorias tecnológicas ainda não exploradas, preenchendo uma lacuna científica relevante, visto que o emprego desses extratos em formulações isentas de glúten permanece incipiente.

Paralelamente, ingredientes funcionais têm sido utilizados para agregar valor nutricional aos produtos sem glúten. A farinha de banana verde (FBV), rica em amido resistente (AR), tem ganhado destaque por seu potencial prebiótico, baixo índice glicêmico e benefícios associado à saúde intestinal (RAMMOHAN *et al.*, 2025). Embora a FBV seja valorizada por seu teor de AR, sua aplicação como base majoritária agrava os desafios de expansão e estrutura dos pães, exigindo ferramentas eficazes, como a utilização de aditivos, para garantir a qualidade do produto final (BASHMIL *et al.*, 2025; CARLIER *et al.*, 2025).

Diante deste cenário, que une a importância econômica do setor, os desafios estruturais das matrizes sem glúten e a oportunidade de valorização de subprodutos, o objetivo deste estudo foi avaliar a aplicação de um EBM produzido por FES na formulação de pães à base de FBV, com foco na melhoria das propriedades físicas e sensoriais, buscando consolidar uma estratégia biotecnológica sustentável e de alto desempenho para o setor.

2. Metodologia

2.1. Produção do extrato bruto multienzimático

O EBM utilizado no presente estudo foi obtido por FES, com base nas condições de fermentação previamente otimizadas por De Oliveira Sena *et al.* (2025). Foi utilizada 5,5g de uma mistura de substratos composta por casca da amêndoa de cacau (73,28%), ora-pró-nóbis (17,64%) e casca de tamarindo (9,09%), inoculada com *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 (10^7 esporos). A fermentação foi conduzida a 22 °C e 62% de umidade.

Para a extração, adicionaram-se 50 mL de água destilada ao meio fermentado, seguido de agitação em incubadora shaker (Quimis, São Paulo, Brasil) (30 °C, 200 rpm, 30 min). Em seguida, o material foi prensado mecanicamente por permeação com gases, e o extrato líquido obtido foi centrifugado (80-2B-15 mL, Centrilab), por 10 min, a 4000 rpm. O sobrenadante resultante foi congelado até o momento das análises e aplicação na produção dos pães.

2.2. Atividades enzimáticas do extrato bruto multienzimático

As atividades de celulase total, amilase, β -mananase e xilanase foram determinadas pelo método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

2.2.1. Celulase e amilase

A atividade de celulase e amilase foram mensuradas de acordo com o protocolo descrito por GHOSE (1987). Foram utilizados como substratos a carboximetilcelulose (CMC) (Cromiline, Diadema, Brasil) e o amido solúvel (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil), respectivamente, ambos na concentração de 1% (p/v), diluídos em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5). A leitura da absorbância foi realizada a 540 nm (SF200DM-UV Vis; Bel Photonics, Osasco, Brasil).

A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μ mol/g/minuto de produto, e os resultados foram expressos em Ug^{-1} .

2.2.2. β -mananase

A atividade de β -mananase foi determinada conforme descrito por Karahalil *et al.* (2020), utilizando a goma de alfarroba a 0,05% (p/v) (Sigma-Aldrich, USA), diluída em tampão citrato de sódio 100 mM (pH 6).

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de D-manose por minuto. Os resultados foram expressos em Ug^{-1} .

2.2.3. Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada utilizando xilana (Sigma-Aldrich, USA) a 1% (p/v) como substrato, conforme protocolo descrito por De Carvalho *et al.* (2023). A leitura da absorbância foi realizada a 540 nm (SF200DM-UV Vis; Bel Photonics, Osasco, Brasil). Os resultados foram expressos em Ug^{-1} .

2.2.4. Protease

A atividade proteolítica foi determinada de acordo com Muñoz-Seijas *et al.* (2024), utilizando azocaseína a 0,5% (p/v) (Sigma-Aldrich, USA), diluída em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5).

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de promover um aumento de 0,01 unidade de absorbância em relação ao branco por minuto, sob as condições do ensaio (37 °C e pH 5). Os resultados foram expressos em Ug^{-1} .

2.2.5. Lacase

A atividade de lacase foi determinada utilizando guaiacol 100 mM como substrato, conforme metodologia descrita por Umar; Ahmed, (2022). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a oxidação de 1 μmol de guaiacol (100 mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por minuto. A atividade foi expressa em Ug^{-1} .

2.2.6. Manganês peroxidase

A atividade de manganês peroxidase foi determinada conforme descrito por Kuwahara *et al.* (1984) com adaptações, utilizando o vermelho de fenol 1% (p/v). A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 610 nm (SF200DM-UV Vis; Bel Photonics, Osasco, Brasil) no tempo inicial e após 5 minutos de reação, e os valores foram utilizados para o cálculo da atividade. Os resultados foram expressos em Ug^{-1} .

2.3. Produção dos pães

2.3.1. Matéria-prima

Frutos da cultivar BRS Terra Anã foram provenientes do campo experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura e utilizados para a obtenção da FBV, conforme Reis *et al.* (2019).

A hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) foi adquirida da fabricante Allimentare. Os demais ingredientes utilizados nas formulações foram obtidos no comércio local.

2.3.2. Análise instrumental da cor e composição centesimal da farinha de banana verde

A FBV foi caracterizada quanto aos teores de umidade, proteínas e cinzas de acordo com os métodos do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). A umidade foi determinada por secagem em estufa a 105 °C até massa constante, enquanto o teor de cinzas foi obtido por incineração em mufla a 550 °C. O teor de proteínas foi quantificado pelo método de Kjeldahl, utilizando-se o fator de conversão de nitrogênio 5,75. A determinação de lipídios foi realizada pelo método descrito por Bligh; Dyer, (1959).

A cor foi avaliada por meio de um colorímetro Minolta® CR400 (Konica Minolta, Osaka, Japão), operado com iluminante padrão D65. O equipamento foi previamente calibrado com placas cerâmicas brancas. As medições foram expressas no sistema de cores CIELAB, considerando as coordenadas L^* (luminosidade; 0 = preto e 100 = branco), C^* (saturação) e o ângulo de cor h^* (hue angle).

2.3.3. Produção dos pães sem glúten à base de farinha de banana verde

As formulações dos pães sem glúten foram baseadas no protocolo descrito por Guadalupe-Moyano *et al.* (2022), com adaptações, conforme apresentado na Tabela 1. A concentração de HPMC foi definida de acordo com Hernández-Aguirre *et al.* (2019), enquanto a proporção do EBM foi estabelecida com base em Costa *et al.* (2021).

Tabela 1- Ingredientes e proporções utilizadas nas formulações dos pães sem glúten, à base de farinha de banana verde.

Ingredientes (%)*	F1	F2	F3	F4
FBV	100	100	100	100
Água	145	72,5	145	72,5
EBM	-	72,5	-	72,5
Açúcar	9	9	9	9
Sal	1,80	1,80	1,80	1,80
Óleo vegetal	6	6	6	6
Gema de ovo	5	5	5	5
Fermento biológico	4	4	4	4
HPMC	-	-	6	6

*Ingredientes calculados com base no percentual da farinha. FBV- Farinha de banana verde; EBM- Extrato bruto multienzimático; HPMC- Hidroxipropilmetilcelulose. F1- Pão com FBV e água; F2- Pão com FBV e EBM; F3- Pão com FBV, água e HPMC (6%); F4- Pão com FBV, EBM e HPMC (6%).

Em todas as formulações, metade do volume total de água foi aquecida a 96 °C e adicionada diretamente sobre a FBV, promovendo a gelatinização parcial do amido com o objetivo de aumentar a capacidade de retenção de gases da massa. Nas formulações F2 e F4, metade da água foi substituída pelo EBM na proporção 1:1, conforme apresentado na Tabela 1. O EBM foi incorporado após a etapa de gelatinização, juntamente com os demais ingredientes, a fim de evitar a desnaturação das enzimas. Após essa etapa, as formulações foram resfriadas até aproximadamente 40 °C e adicionados os ingredientes líquidos (gema, óleo e água ou extrato), seguidos do restante da

FBV, açúcar e sal. Nas formulações F3 e F4, a HPMC foi previamente incorporada aos ingredientes secos. Em seguida, foi aberto um espaço central para a adição do fermento biológico. A mistura foi homogeneizada em batedeira orbital (Cadence Orbit Black Premium – BAT550), na velocidade 5 por 5 minutos, até a obtenção de uma massa uniforme. Porções de 80 g foram transferidas para formas retangulares ($9,5 \times 5,5 \times 3$ cm) e submetidas à fermentação por 1 h a 38 °C e 85% de umidade relativa. A cocção foi realizada em forno convectivo industrial (Venâncio Smart Basic – FCSB4E), previamente aquecido a 180 °C, por 30 minutos. Após o forneamento, os pães foram resfriados à temperatura ambiente e acondicionados em embalagens de polietileno até as análises, a fim de evitar perda de umidade. Todas as formulações foram preparadas em triplicata, adotando-se um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições experimentais.

2.4. Caracterização dos pães sem glúten

2.4.1. Volume, volume específico e densidade

O volume, volume específico e a densidade dos pães foram mensurados 24 horas após o forneamento utilizando um Volscan Profiler (VSP 600, Stable Micro Systems, Godalming, Reino Unido), equipado com sistema de leitura a laser, operando com passo vertical de 0,50 mm e velocidade de rotação de 1,0 rps (SRIVASTAVA *et al.*, 2022). O volume específico foi calculado dividindo-se o volume do pão pelo seu peso. Para cada formulação, foram analisadas seis réplicas.

2.4.2. Análise sensorial

O estudo foi realizado após aprovação pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (CAAE 70943423.1.0000.0056; Parecer nº 6.273.707). Participaram do estudo 61 provadores não treinados, previamente esclarecidos quanto aos procedimentos experimentais, que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, sendo todas as amostras codificadas por números aleatórios de três dígitos.

A avaliação foi realizada em duas etapas. Na primeira, os provadores realizaram a avaliação visual dos pães inteiros, utilizando a escala hedônica estruturada de nove pontos (1 = desgostei muitíssimo; 9 = gostei muitíssimo), além da intenção de compra por meio de escala estruturada de cinco pontos (1 = certamente não compraria; 5 = certamente compraria). Na segunda etapa, as análises foram realizadas em cabines individuais, sob iluminação branca padronizada. Os pães foram cortados em fatias de 1cm de espessura, duas horas após o forneamento, e as extremidades descartadas para evitar interferências associadas à textura da crosta. As amostras obtidas foram

codificadas com números aleatórios de três dígitos, dispostas lado a lado em bandeja plástica branca e apresentadas aos provadores acompanhada de água mineral para limpeza do palato.

Os atributos cor, aroma, sabor, textura e aceitação global foram avaliados, utilizando uma escala estruturada de nove pontos, e a intenção de compra foi determinada por escala estruturada de cinco pontos. Adicionalmente, aplicou-se, escala do ideal para os atributos cor, variando de “muito mais clara do que o ideal” a “muito mais escura do que o ideal”, e textura, variando de “muito mais macia que o ideal” a “muito mais dura que o ideal”.

2.4.3. Análise instrumental da cor e composição centesimal dos pães sem glúten

Foi realizado o estudo da composição centesimal e avaliação da cor da formulação mais aceita na avaliação sensorial e do tratamento controle (F1: FBV + água) para fins comparativos, conforme descrito no Item 2.3.2. A determinação de fibra alimentar total foi conduzida pelo método AOAC 985.29 (PROSKY *et al.*, 1985). O teor de carboidratos foi obtido por diferença [100 - (% de proteínas + % de lipídios + % de umidade + % de cinzas + % de fibra alimentar total)]. O valor calórico total (VCT) foi estimado a partir da soma de carboidratos, proteínas e lipídios, aplicando-se os fatores de conversão de Atwater: 4 kcal g⁻¹ para carboidratos, 4 kcal g⁻¹ para proteínas e 9 kcal g⁻¹ para lipídios.

As análises foram realizadas em triplicata, sendo que para análise de cor, foram realizadas três medidas em pontos distintos da crosta e do miolo. Os resultados foram apresentados como média ± desvio-padrão.

2.5. Análise estatística

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas no software Statistica 8.0.

Os modelos gráficos foram elaborados no software OriginPro, versão 8.5 (OriginLab Corporation, EUA).

2.6. Resultados e discussão

2.6.1. Atividades enzimáticas do extrato bruto multienzimático

O EBM apresentou um perfil enzimático diversificado, composto por enzimas hidrolíticas, incluindo celulase, protease, lacase, xilanase, manganês peroxidase e amilase (Tabela 2). Entre as atividades detectadas, destacou-se a elevada atividade de β -mananase (104,27 Ug⁻¹). Esse desempenho está diretamente relacionado à aplicação de planejamentos estatísticos, que permitiram

otimizar tanto a proporção dos substratos (casca de cacau, ora-pro-nóbis e casca de tamarindo) quanto as condições de cultivo para maximizar a secreção desta enzima específica (De Oliveira SENA *et al.*, 2025). A presença simultânea dessas enzimas é característica de sistemas obtidos por FES, nos quais o microrganismo secreta múltiplas enzimas em resposta à complexidade do substrato lignocelulósico utilizado como fonte de carbono (HUANG; WANG; LIU, 2024).

Tabela 2- Atividade das diferentes enzimas presentes no extrato bruto multienzimático produzidas a partir da mistura de casca da amêndoa de cacau, ora-pró-nóbis e casca de tamarindo por fermentação em estado sólido, utilizando o fungo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110.

Enzima	Atividade (Ug ⁻¹)
β-mananase	104,27 ± 0,05
Celulase	7,75 ± 0,00
Protease	20,02 ± 0,01
Lacase	0,16 ± 0,03
Xilanase	38,53 ± 0,00
Manganês peroxidase	1,31± 0,04
Amilase	0,68 ± 0,01

*Média de três ensaios replicados ± desvio padrão (n=3).

As enzimas identificadas no EBM são amplamente empregadas em diversas matrizes na panificação sem glúten devido à sua capacidade de promover modificações estruturais na massa, influenciando propriedades reológicas e tecnológicas, como viscosidade, elasticidade, textura e volume específico. Tais alterações estruturais impactam diretamente a qualidade final do produto, resultando em maior qualidade sensorial (ALIZADEH-BAHAABADI *et al.*, 2022; QUIZHPE *et al.*, 2026; SARABHAI; TAMILSELVAN; PRABHASANKAR, 2021; ZHAO *et al.*, 2022). Entretanto, a maioria dos estudos disponíveis baseia-se na aplicação de enzimas comerciais purificadas, o que limita a compreensão do efeito de extratos enzimáticos brutos, como o EBM, em matrizes de panificação.

Essa característica constitui uma vantagem tecnológica, pois a modificação simultânea de frações amiláceas, não amiláceas e proteicas promove alterações estruturais mais amplas em comparação ao uso de enzimas isoladas. Assim, o perfil multienzimático observado na Tabela 2 demonstra a versatilidade do EBM, destacando seu potencial para aplicações alimentares que requerem modificações simultâneas nos diferentes componentes da matriz.

2.6.2. Análise instrumental da cor e composição centesimal da farinha de banana verde

As coordenadas cromáticas da FBV (L*: 76,48; C*: 10,79; h*: 101,22) indicam uma matriz de elevada luminosidade, baixa intensidade cromática e tonalidade amarelo-esverdeado, característica de frutos processados em estágios precoces de maturação (Tabela 3).

Tabela 3- Características físico-químicas e composição centesimal da farinha de banana verde (variedade BRS Terra Anã).

Parâmetros	Média*
L*	76,48 ± 0,01
C*	10,79 ± 0,00
h*	101,22 ± 0,08
Umidade (%)	5,35 ± 0,06
Cinzas (%) ¹	1,57 ± 0,05
Proteína (%) ¹	2,09 ± 0,00
Lipídeos (%) ¹	0,58 ± 0,03
Rendimento (%)	20,23

Média ± desvio padrão (n=3). ⁽¹⁾ Resultados expressos em base úmida (b.u). L- Luminosidade; C*- Croma/pureza ou intensidade da cor; h*- hue angle.

Reis *et al.* (2019), reportaram valores superiores de L* (81,51), além de maior cromia (C*: 13,12) e menor ângulo de tonalidade (h*: 90,44) para a mesma variedade, sugerindo coloração mais intensa. Já em estudo realizado por Viana *et al.* (2024), utilizando a variedade Prata, foram descritos valores de L* (73,27), indicando menor luminosidade. Essas diferenças reforçam a influência do genótipo sobre as características cromáticas da farinha (VIANA *et al.*, 2024). Além disso, a brancura da farinha constitui um atributo tecnológico e mercadológico relevante, pois favorece a percepção de qualidade e amplia as possibilidades de aplicação sem comprometer a coloração do produto final (ANYASI; JIDEANI; MCHAU, 2017).

Variações na coloração podem estar associadas à presença ou ausência de casca (VIANA *et al.*, 2024), aos pré-tratamentos empregados (ANYASI; JIDEANI; MCHAU, 2017), ao estágio de maturação e às condições de processamento (RAMMOHAN *et al.*, 2025), bem como ao método de secagem utilizado (GUADALUPE-MOYANO *et al.*, 2022).

O teor de umidade (Tabela 3) está em conformidade com os padrões regulatórios brasileiros para farinhas (máximo de 15%) (BRASIL, 2005), indicando a eficiência do processo de secagem. Esse baixo teor é desejável, pois dificulta o desenvolvimento microbiano e reduz alterações indesejáveis durante o armazenamento, contribuindo para maior estabilidade do produto (SIYAME; KASSIM; MAKULE, 2021). Valores semelhantes foram reportados para farinha de *Musa paradisiaca* (AAA) (5,20%) (GUADALUPE-MOYANO *et al.*, 2022), enquanto teor mais elevado (10,79%) foi observado em farinha comercial (GIRALDO-GÓMEZ; RODRÍGUEZ-BARONA; SANABRIA-GONZÁLEZ, 2019), possivelmente em decorrência de diferenças no processamento.

O teor de lipídeos e cinzas foi de 0,58% e 1,57%, respectivamente (Tabela 3). KUMAR *et al.*, (2019) reportaram valores de lipídeos variando entre 0,17 e 0,42% e de 1,89 a 3,25% de cinzas para farinhas de diferentes variedades, reforçando a influência determinante do genótipo sobre a composição mineral e lipídica da matriz vegetal.

O rendimento de farinha foi de 20,23%, valor que se assemelha aos reportados na literatura para as cultivares Grand Naine (21,23%) e Monthan (23,57%), respectivamente (KUMAR *et al.*, 2019). O rendimento está diretamente relacionado ao teor de matéria seca do fruto, uma vez que maior concentração de sólidos resulta em maior quantidade de farinha após a desidratação. Essa associação foi demonstrada por (REIS *et al.*, 2019), que evidenciaram a influência do genótipo e da composição do fruto sobre o rendimento final da FBV. Além do aspecto tecnológico, maiores rendimentos são fundamentais para viabilidade econômica e melhor aproveitamento da matéria-prima (KUMAR *et al.*, 2019).

2.6.3. Volume, volume específico e densidade dos pães

O volume do pão é um dos principais indicadores de qualidade tecnológica, pois expressa a capacidade da massa de se expandir e de reter os gases formados durante a fermentação e o forneamento. Em sistemas isentos de glúten, esse comportamento é particularmente difícil de ser alcançado, uma vez que a ausência da rede viscoelástica compromete a estabilidade estrutural e a retenção de CO₂ (MENSAH *et al.*, 2026). Os efeitos do EBM e do HPMC sobre essas propriedades nos pães à base de FBV estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4- Volume, volume específico e densidade dos pães sem glúten, elaborados à base de farinha de banana verde.

Formulação	Volume (mL)	Volume específico (mL/g)	Densidade (Kg/m ³)
------------	-------------	--------------------------	--------------------------------

F1	123,38 ^c ± 7,55	2,07 ^c ± 0,02	482,41 ^a ± 4,69
F2	130,60 ^c ± 9,47	1,98 ^c ± 0,07	504,78 ^a ± 16,71
F3	167,98 ^b ± 6,75	2,35 ^b ± 0,18	426,40 ^b ± 32,67
F4	178,61 ^a ± 5,04	2,56 ^a ± 0,02	390,09 ^c ± 3,01

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$) ($n=6$). F1- Pão com farinha de banana verde (FBV) e água; F2- Pão com FBV e extrato bruto multienzimático (EBM); F3- Pão com FBV, água e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) a 6%; F4- Pão com FBV, EBM e HPMC (6%).

As formulações contendo HPMC (F3 e F4) apresentaram volumes significativamente maiores ($p < 0,05$) (Tabela 4) e densidades mais baixas em comparação às formulações sem o hidrocolóide (F1 e F2), conforme exibe a Tabela 4. Esse comportamento pode ser atribuído aos hidrocolóides que têm a capacidade de aumentar a hidratação e a viscosidade da fase contínua da massa, promovendo a formação de uma matriz mais coesa e eficiente na estabilização das células de gás. Além disso, essas redes poliméricas podem mimetizar parcialmente o comportamento funcional do glúten, favorecendo interações intermoleculares e intramoleculares responsáveis pela integridade estrutural da massa (MENSAH *et al.*, 2026; MONTEIRO *et al.*, 2021).

Em contraste, as formulações F1 e F2 exibiram menores volumes específicos e maiores densidades, indicando uma estrutura mais compacta. Esse perfil é típico de matrizes com baixa eficiência de retenção de CO₂, nas quais os gases tendem a escapar por regiões estruturalmente frágeis, limitando a expansão da massa e resultando em pães mais densos e rígidos (GONZÁLEZ; CONTIGIANI; TOLABA, 2024).

Observa-se que o uso isolado do EBM (F2) não promoveu melhorias no volume e na densidade, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas em relação controle (F1). Esse resultado indica que, em uma matriz estruturalmente frágil e com baixa capacidade de retenção de gases como a de FBV pura, a ação enzimática isolada é insuficiente para superar as limitações físicas do sistema.

No entanto, o EBM demonstra grande potencial tecnológico quando utilizado de forma combinada com outros aditivos. A formulação F4, que combinou HPMC e EBM, apresentou o melhor desempenho tecnológico, com volume de 178,61 mL, volume específico de 2,56 mL/g e a menor densidade (390,09 kg/m³), diferindo estatisticamente das demais formulações ($p < 0,05$). Estes valores são indicativos de uma matriz mais aerada, o que sugere, possivelmente, a presença de paredes celulares mais finas, características associadas a uma textura mais macia e leve, favorecendo a aceitação sensorial (CACAK-PIETRZAK *et al.*, 2024).

As diferenças observadas na Tabela 4 corroboram com Figura 1, na qual as formulações contendo HPMC, especialmente na F4, apresentam maior expansão e alvéolos maiores, com miolo mais aerado e uniforme. Em contraste, F1 e F2 exibem estrutura mais compacta.

Esse desempenho superior revela um claro efeito sinérgico entre o HPMC e o EBM, no qual o hidrocolóide confere estabilidade física à matriz, enquanto as enzimas do extrato atuam na modificação estrutural dos polissacarídeos, tornando a rede mais extensível e eficiente na retenção de gases. A eficácia dessa combinação é evidenciada ao comparar F4 com estudos anteriores. O volume obtido foi aproximadamente 130% superior ao relatado por HERNÁNDEZ-AGUIRRE *et al.*, (2019) para pães de FBV otimizados apenas com HPMC 6%.

Dessa forma, o EBM consolida-se como um coadjuvante estratégico para melhorar as propriedades físicas de pães sem glúten, desde que inserido em um sistema com suporte estrutural adequado. Para investigações futuras, sugere-se o estudo de diferentes dosagens desse extrato, a fim de avaliar se variações na concentração poderiam potencializar ainda mais a expansão da massa ou favorecer sistemas com menores teores de hidrocolóides.

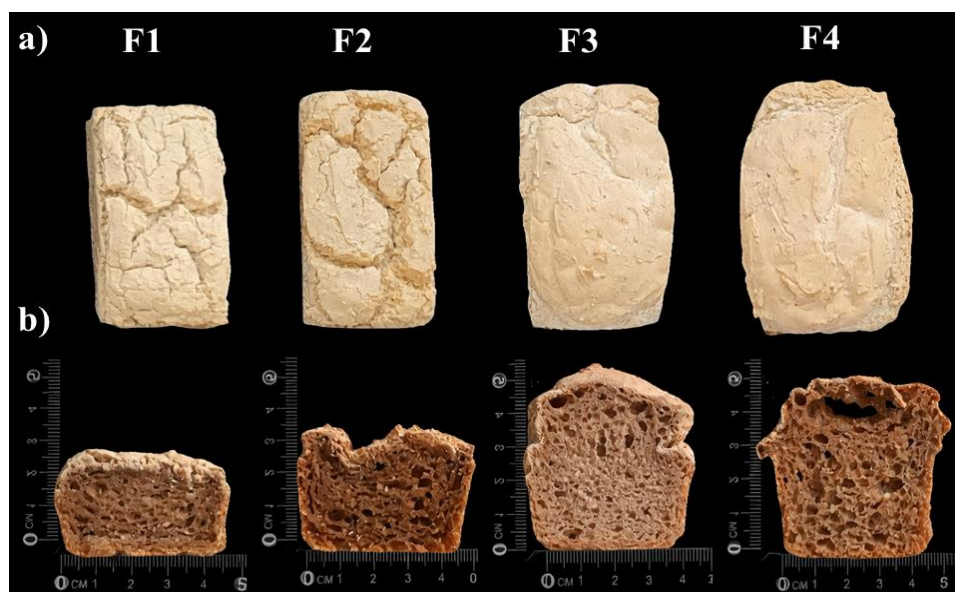


Figura 1- Imagem da crosta **(a)** e fatias **(b)** dos pães sem glúten, à base de farinha de banana verde (FBV). F1- Pão FBV e água; F2- Pão com FBV e extrato bruto multienzimático (EBM); F3- Pão com FBV, água e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) a 6%; F4- Pão com FBV, EBM e HPMC (6%). **Fonte:** A autora.

2.6.4. Análise sensorial

A avaliação sensorial evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre as formulações ($p < 0,05$), refletindo as modificações induzidas pelo EBM e pelo hidrocolóide (HPMC).

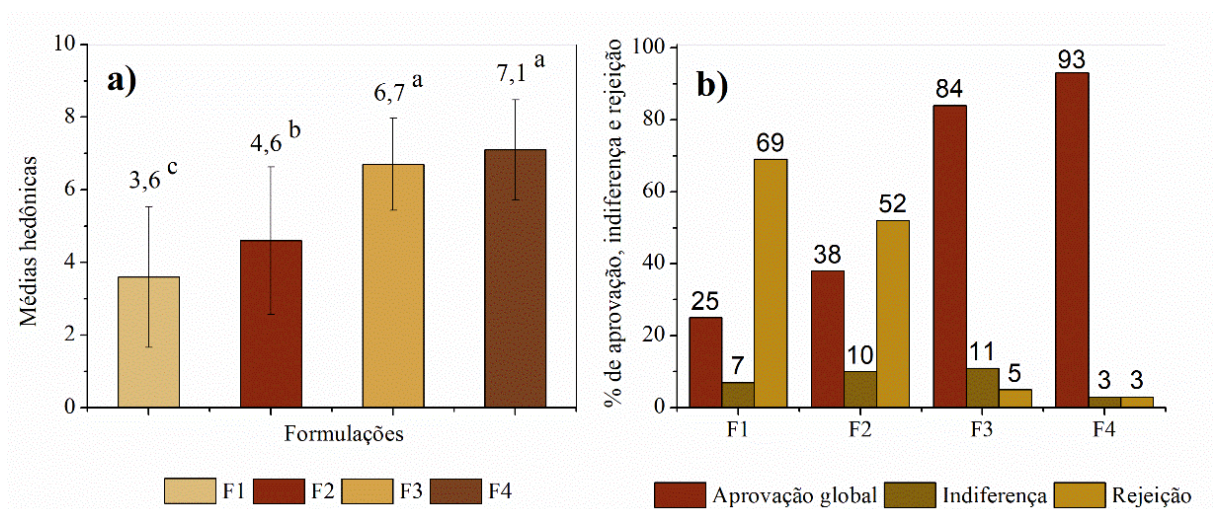


Figura 2- a) Média hedônica da aceitação da aparência externa de pães sem glúten, produzidos à base de farinha de banana verde (FBV). Médias hedônicas (n = 61), obtidas em escala de nove pontos, variando de “gostei muitíssimo” (9) a “desgostei muitíssimo” (1) nos extremos da escala. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). **b)** Aprovação (notas ≥ 6) das formulações. F1- Pão com FBV e água; F2- Pão com FBV e extrato bruto multienzimático (EBM); F3- Pão com FBV, água e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) a 6%; F4- Pão com FBV, EBM e HPMC (6%).

As médias de aceitação da aparência externa dos pães das formulações F3 e F4 não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), com nota equivalente ao termo “gostei” da escala hedônica (Figura 2a), entretanto, o cálculo do percentual de notas superiores a 6, evidenciou maior aprovação global para F4 (93%) (Figura 2b). O desempenho superior da F4 deve-se, primordialmente, ao seu maior volume (Tabela 4) e à coloração mais amarronzada da crosta (Figura 1), o que confere ao produto um aspecto mais próximo ao padrão de panificação convencional.

Em contrapartida, as formulações sem a adição de hidrocolóide, especialmente a F1, apresentou a menor média (3,6), indicando que os provadores “desgostaram pouco” dos pães dessa formulação (Figura 2a). Essa baixa aceitação da F1 pode ser atribuída ao seu baixo volume (Tabela 1) e à coloração excessivamente clara, além de irregularidades e fissuras observadas na superfície do pão (Figura 1A), que comprometeram sua estética.

O impacto visual do produto refletiu diretamente na intenção de compra antes do consumo (Figura 3). A F4 despertou maior interesse dos provadores, apresentando 67,2% de intenção de compra somando-se as categorias “certamente compraria” e “provavelmente compraria”. Em contraste, a F1 registrou elevadas taxas de rejeição (73,8%), considerando-se as categorias

“provavelmente não compraria” e “certamente não compraria”. Esses dados demonstram que a superioridade estrutural dos pães formulados com HPMC, especialmente quando associado ao EBM, contribuiu positivamente a atratividade comercial do produto ainda na fase de avaliação visual.

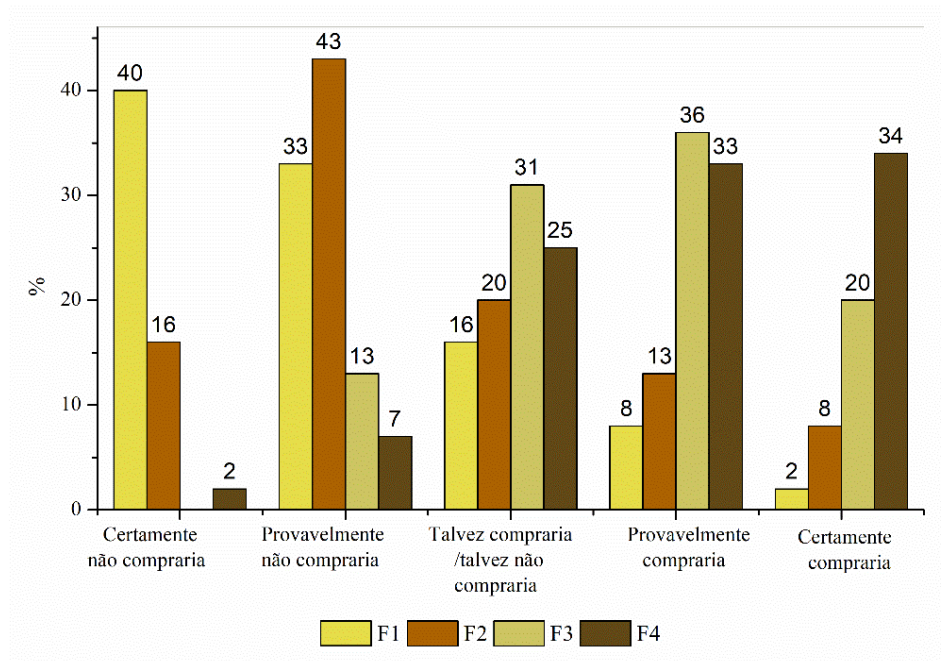


Figura 3- Intenção de compra dos pães sem glúten, produzidos com farinha de banana verde, com base na avaliação da aparência externa. F1- Pão com FBV e água; F2- Pão com FBV e extrato bruto multienzimático (EBM); F3- Pão com FBV, água e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) a 6%; F4- Pão com FBV, EBM e HPMC (6%).

Após o consumo, as distinções entre as formulações tornaram-se ainda mais evidentes, conforme apresentado na Tabela 5. No atributo cor, a F4 destacou-se com média hedônica de 7,2, indicando que os avaliadores “gostaram” do pão, com 90% de aprovação, valor significativamente superior ($p < 0,05$) às demais formulações.

Tabela 5- Médias hedônicas e percentuais de aprovação dos atributos cor, aroma, sabor e textura dos pães sem glúten, à base de farinha de banana verde.

Atributos		F1	F2	F3	F4
Cor	Média ¹	5,3 ^c ± 1,66	5,5 ^c ± 1,90	6,4 ^b ± 1,56	7,2 ^a ± 1,28
	Aprovação ²	51	56	70	90

Aroma	Média ¹	5,8 ^a ± 1,59	5,8 ^a ± 1,61	6,0 ^a ± 1,59	6,2 ^a ± 1,66
	Aprovação ²	54	52	64	69
Sabor	Média ¹	5,2 ^b ± 1,70	5,2 ^b ± 1,85	5,8 ^b ± 1,74	6,5 ^a ± 1,53
	Aprovação ²	46	46	64	75
Textura	Média ¹	5,0 ^c ± 1,83	5,6 ^c ± 1,82	6,3 ^b ± 1,66	7,2 ^a ± 1,27
	Aprovação ²	38	61	80	89
Aprovação global	Média ¹	5,4 ^b ± 1,65	5,8 ^b ± 1,50	6,5 ^a ± 1,35	7,0 ^a ± 1,28
	Aprovação ²	57	59	84	90

⁽¹⁾ Médias hedônicas dos atributos (n=61) ± desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). ⁽²⁾ Percentual de aprovação dos pães sem glúten, à base de farinha de banana verde (FBV) com base no somatório das notas ≥ 6 . F1- Pão com FBV e água; F2- Pão com FBV e extrato bruto multienzimático (EBM); F3- Pão com FBV, água e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) a 6%; F4- Pão com FBV, EBM e HPMC (6%).

Para o atributo aroma, não foram detectadas diferenças significativas ($p > 0,05$) sugerindo que a adição de HPMC e/ou EBM não alterou as características olfativas dos pães à base de FBV.

No atributo sabor, a F4 obteve 75% de aprovação (média 6,5), evidenciando que o EBM e o hidrocolóide contribuíram para uma maior aceitação sabor desse atributo.

A textura da F4 alcançou uma média de 7,2 e 89% de aprovação, sendo significativamente superior ($p < 0,05$) às formulações F1 (5,0; 38%), F2 (5,6; 61%) e F3 (6,3). Este desempenho sensorial é coerente com os dados físicos de volume e densidade (Tabela 4), indicando que a sinergia entre HPMC e EBM resultou em uma estrutura que favoreceu a percepção de leveza e maciez do miolo. Conforme evidenciado na Figura 1, a F4 exibiu alvéolos maiores e mais abertos, distribuídos de forma mais homogênea, característica que desempenhou papel determinante na qualidade textural percebida. Em pães sem glúten, uma estrutura alveolar mais uniforme e aerada está diretamente associada ao melhor desempenho sensorial (IRIGOYTIA *et al.*, 2024).

O percentual de aprovação corroborou os resultados dos atributos sensoriais avaliados individualmente. Nesse contexto, a formulação F4 demonstrou superioridade, atingindo um percentual de aprovação de 90%. Em contrapartida, as formulações F1 e F2 apresentaram aprovação similar (Tabela 5), indicando que os avaliadores “gostaram pouco” dos pães.

O estudo da escala do ideal reforça a superioridade da F4, uma vez que 48% e 52% dos provadores classificaram, respectivamente, a cor e a textura dessa formulação como “ideais”,

enquanto menos de 25% consideraram os mesmos atributos como “ideais” nas formulações F1 e F2 (Figura 4). Essa percepção sensorial de cor ideal correlaciona-se diretamente com perfil cromático mais escuro da F4 (Tabela 7), indicando que os provadores preferem pães com a coloração mais escura, conforme relatado por AMMAR *et al.*, (2022).

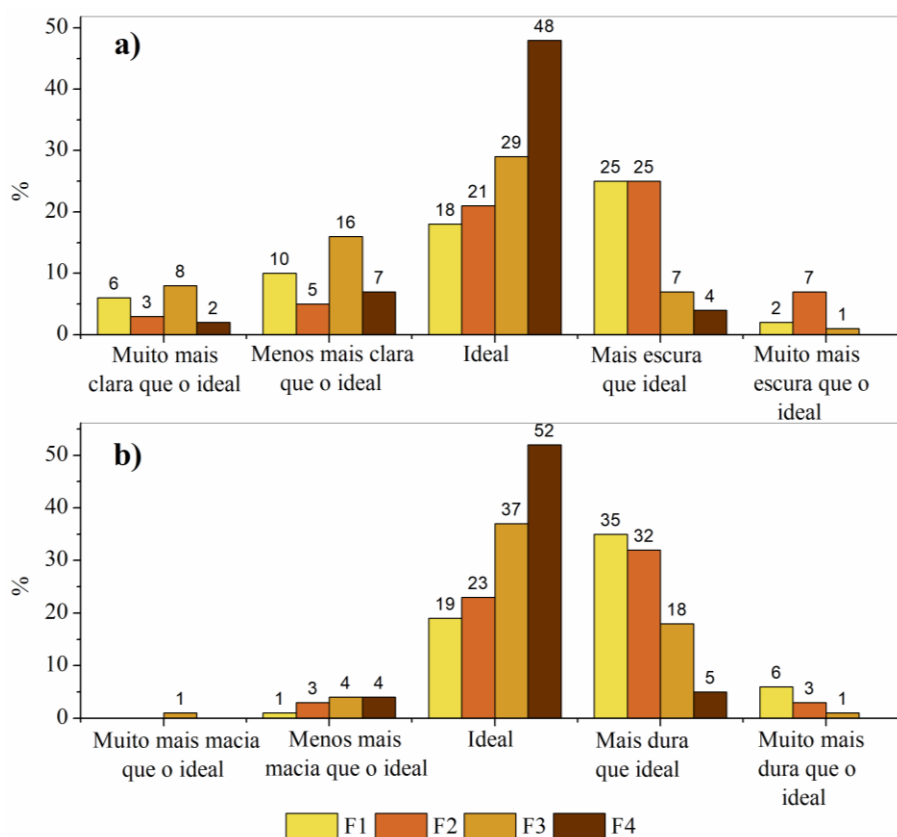


Figura 4- Escala do ideal para os atributos de cor **(a)** e textura **(b)** de pães sem glúten, à base de farinha de banana verde (FBV). F1- Pão com FBV e água; F2- Pão com FBV e extrato bruto multienzimático (EBM); F3- Pão com FBV, água e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) a 6%; F4- Pão com FBV, EBM e HPMC (6%).

A formulação F4 apresentou os maiores percentuais de interesse de compra somando-se as categorias “certamente compraria” e “provavelmente compraria” (35%). Em contrapartida, as formulações F1 e F2 reiteraram o padrão de baixa atratividade, apresentando taxas de rejeição em torno de 30% somando-se as categorias “certamente não compraria” e “provavelmente não compraria”.

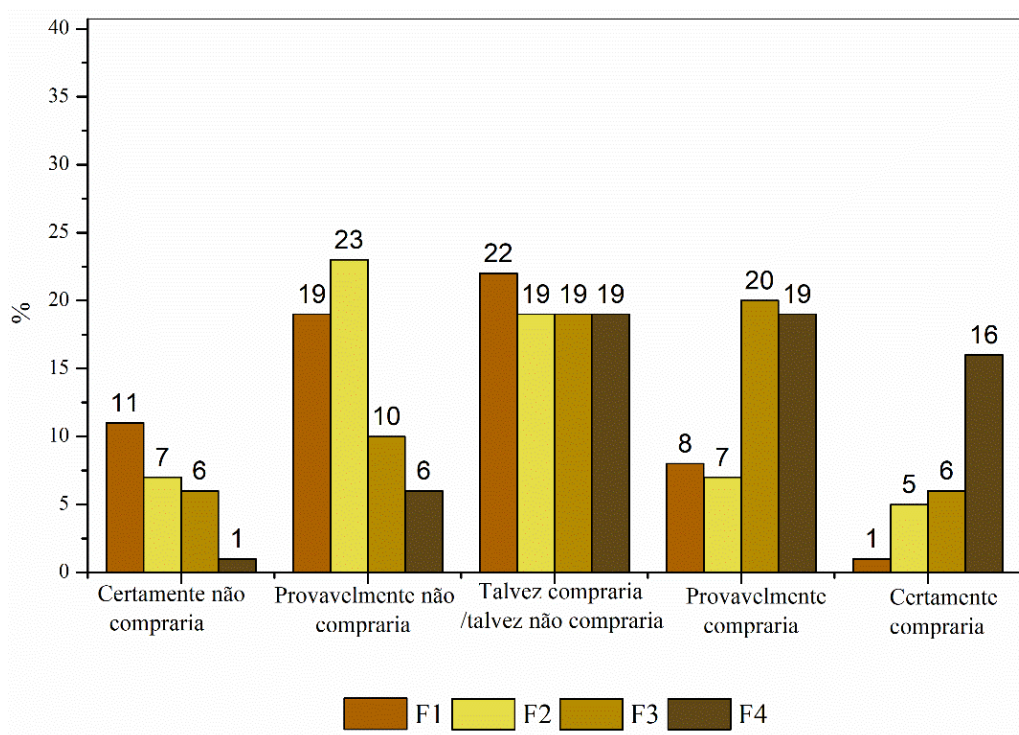


Figura 5- Intenção de compra dos pães sem glúten, produzidos com farinha de banana verde após o consumo. F1- Pão com FBV e água; F2- Pão com FBV e extrato bruto multienzimático (EBM); F3- Pão com FBV, água e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) a 6%; F4- Pão com FBV , EBM e HPMC (6%).

Entretanto, ao comparar a intenção de compra baseada apenas na aparência externa (Figura 3) com aquela obtida após o consumo (Figura 5), observa-se que houve uma redução de aproximadamente 32% na intenção de compra para a formulação F4. Embora essa redução possa sugerir um leve desalinhamento entre expectativa visual e experiência sensorial para parte dos avaliadores, esse resultado deve ser interpretado com cautela. A análise sensorial foi conduzida com painelistas não selecionados especificamente por hábito de consumo de produtos sem glúten, ou por condição clínica como doença celíaca ou alergias alimentares. Consumidores habituados a pães convencionais (trigo) tendem a apresentar maior rigor na comparação com produtos sem glúten, cujas características estruturais e sensoriais são naturalmente distintas (MAGANO; DU RAND; DE KOCK, 2022). Assim, parte da redução observada pode estar associada ao perfil do público analisado e não necessariamente a limitações intrínsecas da formulação.

Em conjunto, os dados evidenciam que a formulação F4, que combina HPMC e EBM, apresentou desempenho sensorial significativamente superior ($p < 0,05$) em aparência, textura, sabor e aprovação global. Esses resultados são consistentes com sua melhor estrutura física e

indicam que a associação entre hidrocolóide e EBM é uma estratégia altamente eficaz para melhorar a qualidade sensorial e a aceitabilidade de pães sem glúten à base de FBV.

2.6.5. Cor da crosta e miolo dos pães

A coloração da crosta e do miolo constitui um dos principais atributos sensoriais determinantes na aceitação do pão pelo consumidor, uma vez que reflete o grau de forneamento, a qualidade tecnológica e a natureza dos ingredientes da formulação (CALLE; BENAVENT-GIL; ROSELL, 2020; DI RENZO *et al.*, 2024).

Os resultados da análise instrumental da cor da crosta e do miolo dos pães sem glúten elaborados com FBV encontram-se detalhados na Tabela 7.

Tabela 6- Análise de cor da crosta e do miolo dos pães sem glúten, à base de farinha de banana verde.

Formulação	Parâmetros de cor		
	L*	C*	h*
Crosta			
F1	64,75 ^a ± 2,40	23,59 ^b ± 2,23	77,14 ^a ± 1,21
F4	49,33 ^b ± 0,63	31,97 ^a ± 0,32	69,77 ^b ± 0,74
Miolo			
F1	47,23 ^a ± 0,55	14,42 ^b ± 0,41	70,35 ^b ± 1,15
F4	47,22 ^a ± 0,98	17,93 ^a ± 0,39	75,86 ^a ± 1,47

Média ± desvio padrão. F1- Pão com FBV e água; F4- Pão com FBV, EBM e HPMC (6%). L*- Luminosidade; C*- Cromo/pureza ou intensidade da cor; h*- hue angle. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si (p > 0,05) de acordo com o teste de Tukey (n=3).

Diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05) foram observadas entre as formulações para todos os parâmetros de cor da crosta. A incorporação do EBM promoveu uma redução significativa (p < 0,05) da luminosidade (L*), que decresceu de 64,75 (F1) para 49,33 (F4), indicando um escurecimento expressivo da superfície da crosta. Esse fenômeno pode ser atribuído à coloração intrínseca do EBM e, fundamentalmente, à maior disponibilidade de açúcares redutores gerados pela atividade enzimática do extrato, os quais atuam como precursores essenciais para as reações de Maillard durante o forneamento (MENSAH *et al.*, 2026). Além disso, estudos indicam que a microestrutura do pão desempenha um papel fundamental, uma vez que matrizes com maior

aprisionamento de gás aumentam a dispersão da luz, o que contribui para valores mais baixos de L^* . Dessa forma, o decréscimo nos valores desse parâmetro está provavelmente associado ao seu maior volume específico (Tabela 4) e, conseqüentemente à maior dispersão de luz (BARTKIENE *et al.*, 2023). Comportamento similar foi relatado por GHODOSIPOOR *et al.*, (2025) em pães sem glúten à base de quinoa com adição de transglutaminase e HPMC.

Paralelamente, a F4 apresentou aumento significativo dos valores de cromaticidade (C^*) e redução do ângulo de tonalidade (h^*) em relação à F1 (Tabela 3), indicando uma coloração mais intensa e deslocamento do perfil cromático para tonalidades mais quentes e amarronzadas.

Adicionalmente, a presença da HPMC na formulação F4, embora não possua propriedades corantes, desempenha um papel relevante, ao promover a retenção de umidade e modificar o comportamento térmico na superfície da crosta, prolongando a cinética das reações de escurecimento não enzimático e caramelização (MENSAH *et al.*, 2026), conforme observado anteriormente em formulações de panquecas sem glúten (MAGHSOUD *et al.*, 2024).

No miolo, a luminosidade (L^*) não diferiu entre as formulações ($p > 0,05$). No entanto, Entretanto, a formulação F4 apresentou maiores valores de C^* e h^* ($p < 0,05$) (Tabela 3), evidenciando coloração mais intensa e tonalidade mais próxima do amarelo quando comparada à F1. Esse resultado sugere que o EBM promoveu modificações na matriz do miolo capazes de intensificar a percepção visual de cor sem comprometer sua claridade.

De modo geral, a adição do EBM exerceu influência marcante no desenvolvimento da cor dos pães, especialmente na crosta, onde promoveu maior escurecimento e intensificação dos tons dourados e amarronzados, enquanto no miolo o efeito foi mais sutil, caracterizado pelo aumento da saturação e do tom amarelado. Esse perfil de coloração aproxima a F4 da aparência típica dos pães convencionais à base de trigo, o que representa uma vantagem tecnológica relevante e contribui positivamente para sua aceitabilidade pelo consumidor (ALIZADEH-BAHAABADI *et al.*, 2022).

2.6.6. Composição centesimal

Os dados de composição dos pães sem glúten são mostrados na Tabela 6.

Não foram observadas diferenças significativas entre as formulações para o teor de fibras, proteína, cinzas, carboidrato e VCT ($p>0,05$).

Tabela 7- Composição centesimal dos pães sem glúten, à base de farinha de banana verde.

Parâmetros (%)	Formulações	
	F1*	F4*

Fibra total ¹	6,60 ^a ± 0,08	7,15 ^a ± 0,44
Umidade ¹	46,35 ^b ± 0,73	47,63 ^a ± 0,20
Cinzas ¹	1,89 ^a ± 0,04	1,84 ^a ± 0,01
Proteína ¹	2,59 ^a ± 0,08	2,41 ^a ± 0,09
Lipídeos ¹	4,54 ^b ± 0,03	6,59 ^a ± 0,48
Carboidrato total ¹	37,64 ^a ± 0,43	34,77 ^a ± 0,93
VCT (Kcal 100g ⁻¹)	201,72 ^a ± 1,29	205,87 ^a ± 1,90

*Média ± desvio padrão (n=3). ⁽¹⁾ Resultados expressos em base úmida (b.u). F1- Pão com FBV e água; F4- Pão com FBV, EBM e HPMC (6%); VCT-Valor calórico total. Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem entre si ($p > 0,05$) de acordo com o teste de Tukey (n=3).

Em relação ao teor de umidade, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações (Tabela 6). A F4 (HPMC + EBM) apresentou maior teor (47,63%) quando comparada à F1 (46,35%). Esse incremento evidencia a influência determinante dos agentes estruturantes na retenção de água dentro da matriz polimérica do pão.

A capacidade da HPMC de intensificar as interações da água com os componentes sólidos da massa favorece a formação de uma rede coesa, reduzindo a perda de vapor de água durante o forneamento. A ausência deste hidrocolóide na F1 justifica sua menor capacidade de retenção, confirmando o papel estratégico da HPMC na estabilização estrutural e preservação hídrica (GHODOSIPOOR *et al.*, 2025).

Este comportamento corrobora achados de estudos anteriores, que verificaram o aumento da umidade em pães com farinha de quinoa integral adicionados de 1,28% de HPMC e transglutaminase, em comparação ao controle (GHODOSIPOOR *et al.*, 2025). De forma consistente, GUADALUPE-MOYANO *et al.*, (2022) relataram teor ainda mais elevado (54,98%) em pães formulados com 100% de FBV e 2% de melhorador (HPMC + carboximetilcelulose), reforçando o efeito combinado de hidrocolóides na retenção de água. A manutenção de níveis elevados de umidade é um parâmetro crítico para a qualidade tecnológica de pães sem glúten. Essa característica está diretamente associada ao prolongamento do frescor e à redução das taxas de endurecimento durante o armazenamento, minimizando a suscetibilidade dessas matrizes ao aumento de firmeza ao longo do tempo (MENSAH *et al.*, 2026).

Observou-se maior teor de lipídeos na F4 ($p < 0,05$), embora a adição de ingredientes lipídicos tenha sido equivalente entre as formulações. Esse resultado pode estar relacionado à

presença da HPMC, que apresenta comportamento termogelificante e formação de filme entre 75–90 °C (VLAD *et al.*, 2025).

2.7. Conclusões

Os resultados demonstram que o EBM, produzido por FES a partir de resíduos agroindustriais, constitui uma estratégia promissora para melhorar a qualidade de pães sem glúten elaborados com FBV. Embora o EBM isoladamente não tenha promovido melhorias estruturais significativas, sua combinação com 6% de HPMC apresentou um claro efeito sinérgico, aumentando o volume do pão (178,61 mL) e o volume específico (2,56 mL/g), além de reduzir a densidade (390,09 kg/m³). Essa melhoria estrutural refletiu-se na aceitação sensorial, com a formulação contendo EBM + HPMC apresentando os maiores escores para textura, sabor e aceitação global (90%), além de maior intenção de compra. De forma geral, os resultados destacam o potencial da valorização de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas como uma abordagem sustentável e eficaz para melhorar as propriedades tecnológicas e sensoriais de produtos panificados sem glúten.

Referências

ALIZADEH-BAHAABADI, G.; LAKZADEH, L.; FOROOTANFAR, H.; AKHAVAN, H.-R. Optimization of gluten-free bread production with low aflatoxin level based on quinoa flour containing xanthan gum and laccase enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 200, p. 61–76, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.091>

AMMAR, I.; SEBII, H.; ALOUI, T.; ATTIA, H.; HADRICHI, B.; FELFOUL, I. Optimization of a novel, gluten-free bread's formulation based on chickpea, carob and rice flours using response surface design. **Heliyon**, v. 8, n. 12, p. e12164, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12164>

ANYASI, T. A.; JIDEANI, A. I. O.; MCHAU, G. R. A. Effects of organic acid pretreatment on microstructure, functional and thermal properties of unripe banana flour. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 11, n. 1, p. 99–110, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9376-2>

BARTKIENE, E.; KUNGIENE, G.; STARKUTE, V.; KLUPSAITE, D.; ZOKAITYTE, E.; CERNAUSKAS, D.; KAMARAUSKIENE, E.; ÖZOGUL, F.; ROCHA, J. M. Psyllium husk gel used as an alternative and more sustainable scalding technology for wheat bread quality improvement and acrylamide reduction. **Frontiers in Nutrition**, v. 10, p. 1277980, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1277980>

BASHMIL, Y. M.; BEKES, F.; RUDERMAN, M.; SULERIA, H. A. R.; APPELS, R.; DUNSHEA, F. R. The Physicochemical and Rheological Properties of Green Banana Flour–Wheat Flour Bread Substitutions. **Plants**, v. 14, n. 2, p. 207, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants14020207>

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/o59-099>

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº263, DE 22 DE SETEMBRO DE 2005. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**, [S. l.: s. n]. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0263_22_09_2005.html

CACAK-PIETRZAK, G.; GRABARCZYK, J.; SZAFRAŃSKA, A.; KRAJEWSKA, A.; DZIKI, D. Cereal Coffee as a Functional Additive in Wheat Bread: Impact on Dough and Bread Properties. **Foods**, v. 13, n. 24, p. 3991, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods13243991>

CALLE, J.; BENAVENT-GIL, Y.; ROSELL, C. M. Development of gluten free breads from Colocasia esculenta flour blended with hydrocolloids and enzymes. **Food Hydrocolloids**, v. 98, p. 105243, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105243>

CARLIER, S.; DAHDOUN, L.; RICCI, J.; GROSMIRE, L. Utilising starchy tropical agri-resources through gluten-free bread-making: the case of cassava, green banana and sweet potato flours. **LWT**, v. 234, p. 118595, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.118595>

COSTA, R. D. S.; DE ALMEIDA, S. S.; CAVALCANTI, E. d'Avila C.; FREIRE, D. M. G.; MOURA-NUNES, N.; MONTEIRO, M.; PERRONE, D. Enzymes produced by solid state fermentation of agro-industrial by-products release ferulic acid in bioprocessed whole-wheat breads. **Food Research International**, v. 140, p. 109843, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109843>

Cunniff and Association of Official Analytical Chemists. 1997. Official methods of analysis of AOAC international. 16 ed. Gaithersburg (MD): Association of Official Analytical Chemists (AOAC International).

DE CARVALHO, M. S. *et al.* Application of Chemometric Methods for the Optimization Secretion of Xylanase by *Aspergillus oryzae* in Solid State Fermentation and Its Application in the Saccharification of Agro-industrial Waste. **Waste and Biomass Valorization**, v. 14, n. 10, p. 3183–3193, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01832-8>

DE OLIVEIRA SENA, L. *et al.* Exploring β -mannanase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 on cocoa bean shell, tamarind peel, and ora-pro-nobis for enhanced saccharification processes. **3 Biotech**, v. 15, n. 12, p. 441, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-025-04595-w>

D'HEEDENE, M.; VANUYTSEL, T.; WAUTERS, L. Celiac disease: Hope for new treatments beyond a gluten-free diet. **Clinical Nutrition**, v. 43, n. 6, p. 1240–1249, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2024.04.014>

DI RENZO, T.; TRIVISONNO, M. C.; NAZZARO, S.; REALE, A.; MESSIA, M. C. Effect of Different Hydrocolloids on the Qualitative Characteristics of Fermented Gluten-Free Quinoa Dough and Bread. **Foods**, v. 13, n. 9, p. 1382, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods13091382>

GHODOSIPOOR, Z.; ZAHED, O.; FALLAHZADEH, H.; MOLLAKHALILI-MEYBODI, N.; NEMATOLLAHI, A. Optimization of Quinoa-Based Gluten-Free Bread Production Using Microbial Transglutaminase Enzyme and Hydroxypropyl Methyl Cellulose (HPMC) by Response Surface Methodology. **Food Science & Nutrition**, v. 13, n. 9, p. e70891, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/fsn3.70891>

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>

GIRALDO-GÓMEZ, G. I.; RODRÍGUEZ-BARONA, S.; SANABRIA-GONZÁLEZ, N. R. Preparation of instant green banana flour powders by an extrusion process. **Powder Technology**, v. 353, p. 437–443, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.05.050>

GONZÁLEZ, L. C.; CONTIGIANI, E. V.; TOLABA, M. P. Development of gluten-free and gum-free rice bread: influence of ingredients, hydration and processing time on bread quality. **Discover Food**, v. 4, n. 1, p. 61, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s44187-024-00112-9>

Grand View Research. (2026). Gluten-free Products Market, Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Bakery Products, Dairy/ Dairy Alternatives), By Distribution Channel (Specialty Stores, Online), By Region, And Segment Forecasts, 2026 – 2033. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/gluten-free-products-market>.

Grand View Research. (2025). Gluten-Free Bread Market, Size, Share & Trends Analysis Report By Distribution Channel (Hypermarkets & Supermarkets, Convenience Stores, Speciality stores, Online), By Region (North America, APAC, Europe), And Segment Forecasts, 2025 – 2030. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/gluten-free-bread-market-report>.

GUADALUPE-MOYANO, V.; PALACIOS-PONCE, A. S.; ROSELL, C. M.; CORNEJO, F. Impact of drying methods on banana flour in the gluten-free bread quality. **LWT**, v. 168, p. 113904, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113904>

HERNÁNDEZ-AGUIRRE, M. A.; ISLAS-HERNÁNDEZ, J. J.; SÁNCHEZ-PARDO, M. E.; RODRÍGUEZ-AMBRIZ, S. L.; OSORIO-DÍAZ, P. Response surface methodology for optimization of gluten-free bread made with unripe banana flour. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 13, n. 3, p. 1652–1660, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00082-y>

HUANG, J.; WANG, J.; LIU, S. Advances in the production of fungi-derived lignocellulolytic enzymes using agricultural wastes. **Mycology**, v. 15, n. 4, p. 523–537, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21501203.2023.2253827>

IAL. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4ª ed. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020p.

- IRIGOYTIA, K. F.; ESPÓSITO, N. N.; DE ESCALADA PLA, M. F.; PARODI, M. B.; GENEVOIS, C. E. Technological and multi-sensory analysis approach to holistically understand the quality and consumer perception of gluten-free breads with alternative flours. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 59, n. 11, p. 8606–8614, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ijfs.17557>
- KARAHALIL, E.; GERMEC, M.; KARAOGLAN, M.; YATMAZ, E.; COBAN, H. B.; INAN, M.; TURHAN, I. Partial purification and characterization of a recombinant β -mannanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Aspergillus sojae* grown on carob extract. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 10, n. 4, p. 1189–1205, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00487-1>
- KUMAR, P. S.; SARAVANAN, A.; SHEEBA, N.; UMA, S. Structural, functional characterization and physicochemical properties of green banana flour from dessert and plantain bananas (*Musa* spp.). **LWT**, v. 116, p. 108524, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108524>
- KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracellular $H_2 O_2$ -dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, n. 2, p. 247–250, 1984. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)80327-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)80327-0)
- LIU, L.; YANG, H.; ZHANG, Q.; CHEN, X.; WANG, Y.; SHEN, Q.; DING, W. Gluten composition, modification, and applications in gluten-free food: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 346, p. 150625, 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2026.150625>
- MAGANO, N.; DU RAND, G.; DE KOCK, H. Perception of Gluten-Free Bread as Influenced by Information and Health and Taste Attitudes of Millennials. **Foods**, v. 11, n. 4, p. 491, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods11040491>
- MAGHSOUD, M.; HESHMATI, A.; TAHERI, M.; EMAMIFAR, A.; ESFARJANI, F. The influence of carboxymethyl cellulose and hydroxypropyl methylcellulose on physicochemical, texture, and sensory characteristics of gluten-free pancake. **Food Science & Nutrition**, v. 12, n. 2, p. 1304–1317, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/fsn3.3844>
- MENSAH, P. O.; OSEI TUTU, C.; AKONOR, P. T.; OWUSU-BEMPAH, J.; ASIEDU, B. K.; ADUSEI, H. O.; SAALIA, F. K. Development and evaluation of gluten-free rice bread formulated with hydrocolloid-protein additive systems. **Food and Humanity**, v. 6, p. 100956, 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2025.100956>
- MILLER, G. L. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428. **Anal. Chem**, v. 31, 1959.
- MONTEIRO, J. S.; FARAGE, P.; ZANDONADI, R. P.; BOTELHO, R. B. A.; DE OLIVEIRA, L. D. L.; RAPOSO, A.; SHAKEEL, F.; ALSHEHRI, S.; MAHDI, W. A.; ARAÚJO, W. M. C. A Systematic Review on Gluten-Free Bread Formulations Using Specific Volume as a Quality Indicator. **Foods**, v. 10, n. 3, p. 614, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods10030614>

- MUÑOZ-SEIJAS, N.; FERNANDES, H.; OUTEIRIÑO, D.; MORÁN-AGUILAR, M. G.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SALGADO, J. M. Potential use of frass from edible insect *Tenebrio molitor* for proteases production by solid-state fermentation. **Food and Bioproducts Processing**, v. 144, p. 146–155, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2024.01.002>
- PROSKY, L.; ASP, N.-G.; FURDA, I.; DEVRIES, J. W.; SCHWEIZER, T. F.; HARLAND, B. F. Determination of Total Dietary Fiber in Foods and Food Products: Collaborative Study. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 68, n. 4, p. 677–679, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jaoac/68.4.677>
- QUIZHPE, J.; PEÑALVER, R.; AYUSO, P.; NIETO, G. Nutritionally Improved Gluten-Free Breads Fortified with Soluble Fiber and Bioactive Compounds from Artichoke and Broccoli By-Products. **Molecules**, v. 31, n. 1, p. 152, 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules31010152>
- RAMMOHAN, Y.; SHUPRAJHAA, T.; KUMAR, P. S.; VASUDEVAN, V.; SIVAPRASAD, M.; PRASAD, T. N. V. K. V.; KRISHNA, V. N. P. S.; SIREESHA, Y. Impact of maturity stages and modification processes on resistant starch and starch properties of green banana flour and its glycaemic response. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 311, p. 143881, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.143881>
- REIS, R. C.; VIANA, E. D. S.; ASSIS, S. L. F. D.; SENA, L. D. O.; SOUZA, A. D. S. D.; AMORIM, E. P. Promising green banana and plantain genotypes for making flour. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, p. e01303, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1678-3921.pab2019.v54.01303>
- SARABHAI, S.; TAMILSELVAN, T.; PRABHASANKAR, P. Role of enzymes for improvement in gluten-free foxtail millet bread: It's effect on quality, textural, rheological and pasting properties. **LWT**, v. 137, p. 110365, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110365>
- SHUSHARI, M. K.; WEI, T.; ZHANG, J.; TIDWELL, D. K.; CONARD, A.; TOLAR-PETERSON, T. Adherence to a gluten-free diet, depression, and nutrient distribution in participants with celiac disease. **Nutrition**, v. 132, p. 112676, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2024.112676>
- SILVA, F. N. *et al.* Sustainable Sugar Syrup Production from Rice Husk Using *Aspergillus niger* Carbohydrase. **ACS Omega**, v. 10, n. 29, p. 32161–32173, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsomega.5c03929>
- SIYAME, P.; KASSIM, N.; MAKULE, E. Effectiveness and Suitability of Oyster Mushroom in Improving the Nutritional Value of Maize Flour Used in Complementary Foods. **International Journal of Food Science**, v. 2021, p. 1–8, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2021/8863776>
- SRIVASTAVA, S.; KOLLEMPAREMBIL, A. M.; ZETTEL, V.; CLASSEN, T.; MOBARAK, M.; GATTERNIG, B.; DELGADO, A.; JEKLE, M.; HITZMANN, B. An Innovative Approach in the Baking of Bread with CO₂ Gas Hydrates as Leavening Agents. **Foods**, v. 11, n. 22, p. 3570, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods11223570>

UMAR, A.; AHMED, S. Optimization, purification and characterization of laccase from *Ganoderma leucocontextum* along with its phylogenetic relationship. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 2416, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06111-z>

VIANA, L. M. *et al.* Green banana (*Musa ssp.*) mixed pulp and peel flour: A new ingredient with interesting bioactive, nutritional, and technological properties for food applications. **Food Chemistry**, v. 451, p. 139506, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139506>

VLAD, R.-A.; PINTEA, A.; PINTEA, C.; RÉDAI, E.-M.; ANTONOAEA, P.; BÎRSAN, M.; CIURBA, A. Hydroxypropyl Methylcellulose—A Key Excipient in Pharmaceutical Drug Delivery Systems. **Pharmaceutics**, v. 17, n. 6, p. 784, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17060784>

ZHAO, F.; LI, Y.; LI, C.; BAN, X.; GU, Z.; LI, Z. Exo-type, endo-type and debranching amylolytic enzymes regulate breadmaking and storage qualities of gluten-free bread. **Carbohydrate Polymers**, v. 298, p. 120124, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120124>

Considerações finais

Como perspectivas futuras, recomenda-se aprofundar a elucidação dos mecanismos estruturais envolvidos na ação do sistema enzimático, por meio de análises microestruturais e reológicas que permitam correlacionar modificações na matriz com o desempenho tecnológico observado. A investigação de diferentes dosagens do extrato, especialmente em associação à redução de hidrocolóides poderá contribuir para a otimização da formulação e para o aumento da viabilidade industrial. Adicionalmente, estudos de estabilidade durante o armazenamento e de impacto na digestibilidade são essenciais para ampliar a compreensão do comportamento tecnológico e funcional da estratégia desenvolvida. Por fim, a condução de testes com consumidores habituais de produtos sem glúten poderá gerar evidências mais consistentes quanto à aceitação e ao potencial de inserção mercadológica.