

Concentração de enzimas amilolíticas na hidrólise do amido de gengibre

Amylolytic enzymes concentration in the starch hydrolysis of ginger

Lívia Maria Torres^I Magali Leonel^{II} Martha Maria Mischan^{III}

RESUMO

Uma possibilidade de incremento na cadeia produtiva do gengibre seria o uso de rizomas desclassificados para comercialização in natura, ou mesmo o resíduo da extração de óleos, como matérias-primas para a obtenção de bebidas destiladas. O amido não é diretamente fermentável, necessitando de uma hidrólise prévia de suas cadeias para a obtenção de glicose. Neste trabalho, objetivou-se avaliar o efeito das concentrações de amilases sobre o perfil de açúcares e rendimento no processo de hidrólise-sacarificação de gengibre. O processo seguiu o delineamento central composto rotacional para dois fatores, totalizando 11 tratamentos. Os resultados obtidos mostram o efeito das concentrações de α -amilase (Termamyl 2X) e da amiloglicosidase (AMG 300L) sobre o teor de glicose do hidrolisado e efeito da concentração de amiloglicosidase sobre o teor de dextrina. Os maiores rendimentos de hidrólise da suspensão de gengibre foram obtidos nas condições de elevada concentração de α -amilase e amiloglicosidase.

Palavras-chave: *Zingiber officinale*, amido, enzimas, glicose, rendimento.

ABSTRACT

The use of disqualified ginger rhizomes as raw material for fresh fruit market is a way to allow the increase of ginger production. The starch is not directly fermentable, which requires prior hydrolysis to obtain glucose. This study aimed to evaluate the effect of concentrations of α -amylase and amyloglucosidase on the yield and sugar profile in the process of hydrolysis-saccharification of ginger. The process followed the central composite design for two factors, totaling 11 treatments. The results showed the effect of concentrations of α -amylase (Termamyl 2X) and amyloglucosidase (AMG 300L)

on the glucose content and amyloglucosidase concentration effect on the content of dextrin. The higher yields of hydrolysis of the ginger suspension were obtained under conditions of high concentration of α -amylase and amyloglucosidase.

Key words: *Zingiber officinale*, starch, enzymes, glucose, yield.

INTRODUÇÃO

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), planta da família *Zingiberaceae*, é originário do sudoeste asiático. É comercializado internacionalmente, na forma seca, além dos rizomas, sob a forma de produtos derivados, tais como o óleo essencial e a oleorresina.

A área de cultivo mundial de gengibre é de aproximadamente 320 mil hectares, com uma produção média de 800.775 toneladas e valor comercial estimado em 185 milhões de dólares (NEGRELLE et al., 2005; HERBS & SPICES, 2008). Atualmente, Índia e China são os maiores produtores mundiais. Segundo ALMEIDA (2007), o Brasil produz cerca de 7 mil toneladas ano⁻¹, ao preço médio de US\$ 0,7 kg⁻¹, cuja produção é orientada para exportação. Os principais estados brasileiros produtores de gengibre são: Espírito Santo, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (GARCIA, 2006).

Frente ao conteúdo de amido presente no rizoma, uma possibilidade de incremento da cadeia

^ICoordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), Guaíçara, SP, Brasil.

^{II}Centro de Raízes e Amidos Tropicais (CERAT), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), 18610-307, Botucatu, SP, Brasil. E-mail: mleonel@cerat.unesp.br. Autor para correspondência.

^{III}Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências (IB), UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

produtiva do gengibre seria a produção de bebida destilada, a qual poderia ser obtida a partir de rizomas de baixa qualidade para exportação e/ou a partir do resíduo da extração dos óleos essenciais por indústrias processadoras desse rizoma.

O amido não é diretamente fermentável, necessitando de uma hidrólise prévia de suas cadeias para a obtenção de glicose. No processo de hidrólise, além de água, há necessidade de agentes químicos ou enzimáticos capazes de romper as ligações glicosídicas (ZANIN et al., 2000).

A hidrólise enzimática tem sido muito utilizada pelas indústrias na produção de etanol de amiláceos. Uma das características mais importantes da catálise enzimática é sua especificidade, muito maior do que a da catálise química, quanto à reação e quanto ao substrato.

As enzimas amilolíticas representam o grupo enzimático de grande aplicação industrial. A alfa-amilase é uma endoenzima carboidrase com atividade hidrolítica das ligações α -1,4 em polissacarídeos dispersos em meio aquoso, contendo, pelo menos, três resíduos de glicose na cadeia. Algumas alfa-amilases apresentam atividade de hidrólise das ligações glicosídicas α -1,6, mas com eficiência reduzida (LÉVEQUE et al., 2000; SUVD et al., 2001).

A amiloglucosidase é uma enzima sacarificante utilizada para produzir glicose a partir do amido, hidrolisando ligações tipo α -1,4 e α -1,6. A ação da amiloglucosidase é lenta no ataque inicial à amilose, pois, sendo uma exoenzima, só atua a partir da extremidade não-redutora e não penetra no interior da estrutura helicoidal da amilose (OBEL, 2001).

O processo de hidrólise enzimática do amido é realizado em duas etapas: a liquefação e a sacarificação. No processo de liquefação, os grânulos de amido são dispersos em solução aquosa, aquecidos (causando a gomificação) e hidrolisados parcial e irreversivelmente, com auxílio de uma α -amilase (MAAREL et al., 2002). A temperatura de gomificação varia bastante entre os amidos de diferentes fontes botânicas, oscilando na faixa de 65 a 105°C, sendo necessário muitas vezes o emprego de altas temperaturas para a total gomificação.

Após a liquefação, a solução de maltodextrina é hidrolisada em glicose por uma enzima desramificante, seja endoenzima (isoamilase e pululanase) ou uma exoenzima (β -amilase e glicoamilase), atuando sobre as ligações glicosídicas α -1,6 da amilopectina (MAAREL et al., 2002). O resultado dessa segunda etapa é uma solução de sacarídeos de baixo peso molecular como glicose e maltose.

A concentração de enzimas é fator fundamental na hidrólise de derivados amiláceos e interfere substancialmente no processo. Encontrar a

concentração ideal para o processo caracteriza uma hidrólise eficiente. Neste trabalho, buscou-se avaliar o efeito da concentração da α -amilase (Termamyl 2X) e da amiloglucosidase (AMG 300L) sobre o perfil de açúcares no processo de hidrólise-sacarificação de suspensão de gengibre, visando à obtenção de maior rendimento em açúcares fermentescíveis.

MATERIAL E MÉTODOS

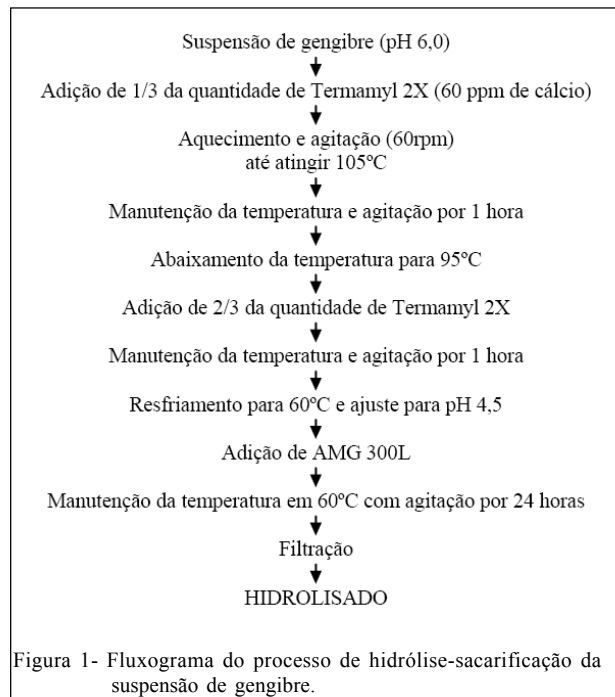
Foram utilizados como matéria-prima rizomas frescos de gengibre do tipo caipira, produzidos na região de Tapiraí-SP.

Os rizomas de gengibre foram caracterizados quanto aos teores de umidade, amido, fibras, açúcares totais, cinzas, matéria graxa e proteínas (AACC, 1983; SOMOGY, 1945).

Para o preparo da suspensão, os rizomas foram previamente lavados e triturados em cevadeira industrial. Em seguida, foi adicionada água de forma que a suspensão ficasse com 10% de amido. O processo foi conduzido em reator em aço inox, com agitação e controle de temperatura e capacidade de 18 litros.

No processo de hidrólise-sacarificação da suspensão de gengibre, foram utilizadas enzimas comerciais produzidas pela Novozymes A/S. Na etapa de liquefação, utilizou-se a Termamyl 2X. Esse produto é um preparado enzimático líquido e concentrado, a base de α -amilase termo-estável, produzido a partir de uma cepa selecionada de *Bacillus licheniformes*, que hidrolisa as ligações α -1,4 da amilose e da amilopectina, convertendo o amido em dextrinas e oligossacarídeos solúveis. O pH ótimo de ação enzimática está entre 6 e 8 e temperatura de 90 a 105°C, devendo-se adicionar no meio de reação de 30 a 60mg kg⁻¹ de cálcio a fim de otimizar a atividade da enzima (NOVOZYMES, 2003). Na sacarificação, utilizou-se a AMG 300L que é uma amiloglucosidase de grau alimentício, produzida a partir de uma cepa selecionada de *Aspergillus niger*. A enzima hidrolisa as ligações α -1,4 e α -1,6 do amido liquefeito. O pH ótimo de ação enzimática está entre 4 e 4,5 e temperatura de 58 a 60°C (NOVOZYMES, 2004). A figura 1 mostra as etapas do processo de hidrólise e sacarificação do gengibre.

Para a avaliação do efeito da concentração das enzimas na obtenção de açúcares, foi utilizado o delineamento 'central composto rotacional' para dois fatores, com um total de 11 tratamentos (BARROS NETO et al., 2007), a saber: quatro tratamentos correspondentes ao fatorial 2², em que os dois fatores são: concentração de Termamyl 2X (g kg⁻¹ amido) e concentração de AMG 300L (mL kg⁻¹ amido), cada qual em dois níveis, codificados como -1 e +1; quatro tratamentos com níveis mínimo e máximo de cada fator,



codificados como $-\alpha$ e $+\alpha$, respectivamente, sendo $\alpha = 2^{2/4} = 1,41$; e um tratamento central repetido três vezes, no qual os fatores estão todos em um nível médio, codificado como zero (Tabela 1).

Os hidrolisados obtidos foram caracterizados quanto aos açúcares em cromatógrafo líquido Varian, modelo Pró-Star, com duas bombas binárias e índice de refração (detector) com amostrador automático, sendo a coluna BIORAD modelo AMINEX

HPX 87P (fase estacionária Pb) 300x0,25mm, utilizando como fase móvel água e fluxo da amostra de $0,6 \text{ ml min}^{-1}$, na temperatura de 80°C , o que permite a quantificação de sacarídeos de grau de polimerização (Dp) de 1 a 9. Os perfis em área foram convertidos em concentração (g L^{-1}) a partir de curvas padrões.

O rendimento do processo de hidrólise foi determinado pela razão entre o conteúdo de glicose no hidrolisado (g) após a separação das fibras e o

Tabela 1 – Delineamento experimental do processo de hidrólise-sacarificação do gengibre.

Tratamentos	-----Variáveis independentes-----			
	-----Codificadas-----		-----Reais-----	
	X1	X2	Termamyl 2X (g kg^{-1} amido)	AMG 300L (mL kg^{-1} de amido)
1	-1	-1	0,80	1,50
2	-1	1	0,80	3,00
3	1	-1	1,60	1,50
4	1	1	1,60	3,00
5	0	0	1,20	2,25
6	0	0	1,20	2,25
7	0	0	1,20	2,25
8	-1,41	0	0,50	2,25
9	1,41	0	1,88	2,25
10	0	-1,41	1,20	0,97
11	0	1,41	1,20	3,53

conteúdo teórico de glicose calculado através do conteúdo inicial de amido e glicose em gramas na suspensão de gengibre.

O processamento dos dados e a análise estatística foram realizados com o auxílio do RSREG e do STEP-WISE do sistema SAS (SAS, 2003). A significância do modelo foi testada pela análise de variância (ANOVA). Foi adotado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas análises de caracterização físico-química dos rizomas de gengibre mostraram elevado teor de umidade (83,09%), com considerável teor de amido (67,41%) e 6,44% de cinzas, 10,29% de proteínas, 8,69% de fibras, 1,95% de matéria graxa e 4,73% de açúcares solúveis, em base da massa seca. Os resultados obtidos estão próximos aos relatados por TAVEIRA et al. (1997) que, analisando dois tipos de gengibre cultivados no Brasil, observaram composição química variável para rizomas de gengibre caipira: 80 a 90% de umidade e 76,3 a 84,8% de carboidratos totais, 5,6 a 13,8% de proteína, 3,6 a 8,4% de extrato etéreo, 5,5 a 11,7% de fibras e 4,3 a 8,0% de cinzas (massa seca).

A análise cromatográfica dos açúcares presentes nos hidrolisados de gengibre mostrou a presença de glicose e dextrinas nas diferentes condições experimentais testadas. Não foram detectados outros açúcares nos hidrolisados.

A análise dos coeficientes de regressão mostrou ter ocorrido efeito das concentrações das enzimas sobre o teor de glicose e da concentração da AMG 300L sobre o teor de dextrina nos hidrolisados (Tabela 2).

Os teores de glicose nos hidrolisados variaram entre 79,87g L⁻¹ e 109,06g L⁻¹. As maiores

concentrações de Termamyl 2X e AMG 300L permitem a obtenção de maiores teores de glicose no hidrolisado (Figura 2).

A formação de dextrinas se dá a partir da quebra das ligações α -1,4 da molécula do amido, aleatoriamente, pelas enzimas denominadas α -amilases. Os teores de dextrina nos hidrolisados variaram de 0,179g L⁻¹ a 1,432g L⁻¹. Quanto maior a concentração de amiloglicosidase, menor a concentração de dextrina encontrada no extrato hidrolisado (Figura 2).

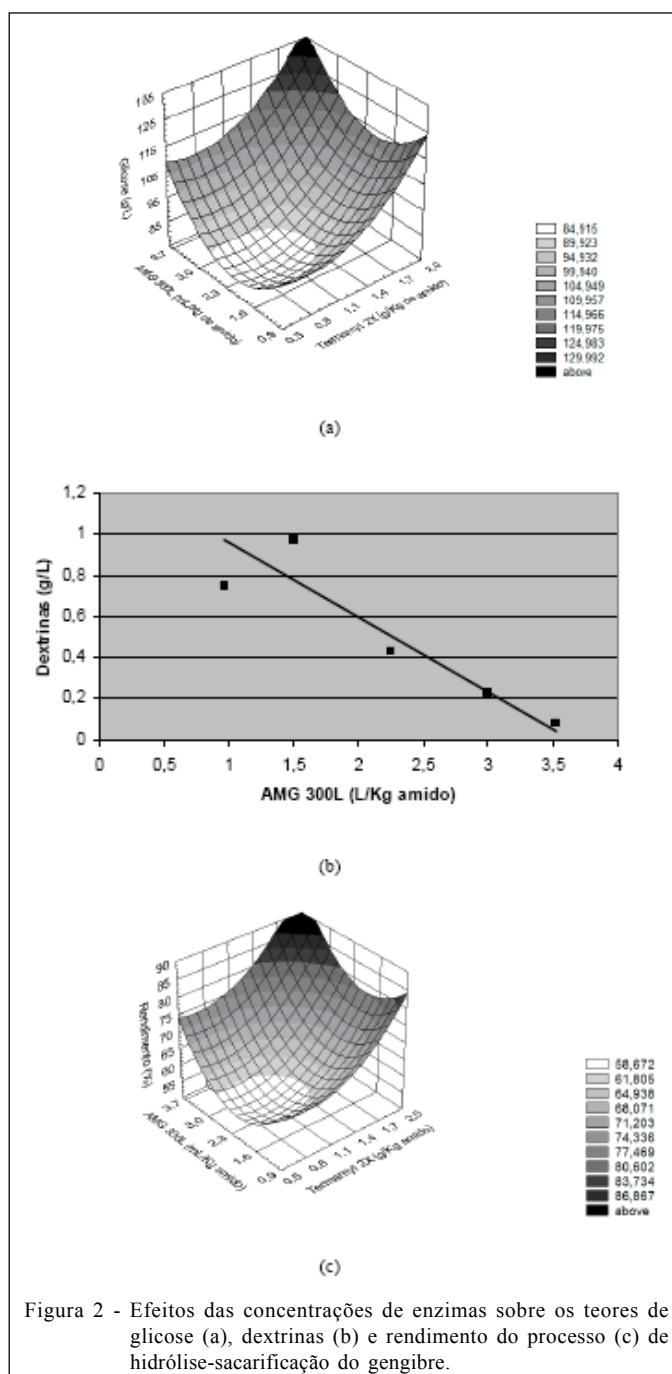
As amilases, de uma maneira geral, agem na superfície do grânulo de amido, provavelmente em uma imperfeição estrutural ou fissura e, depois, estendem-se lateralmente formando cavidades cônicas. A ação contínua da α -amilase causa erosão nos grânulos que podem ser, eventualmente, dissolvidos completamente. A α -amilase se caracteriza tanto por atacar a amilose quanto a amilopectina. O complexo enzima-substrato formado possui uma conformação ideal para a catálise. Como a α -amilase não consegue quebrar as ramificações, a hidrólise da amilopectina é limitada, fazendo com que sejam produzidas dextrinas limites ou oligossacarídeos, que possuem todos os pontos de ramificação. São as amiloglicosidases que vão terminar de quebrar as cadeias maiores (dextrinas) em glicose e, quando a concentração dessas enzimas não é suficiente, o processo de hidrólise é parcial (LÉVEQUE et al., 2000; SUVD et al., 2001).

Através da análise de regressão, pôde-se observar efeito significativo ($P < 0,05$) dos fatores concentração de Termamyl e da AMG sobre o rendimento prático do processo de hidrólise. Os valores de rendimento variaram de 55,41% a 75,66%. É preciso salientar que esses rendimentos expressam os açúcares presentes no hidrolisado após a filtração, sendo que parte dos açúcares obtidos pode ter ficado no resíduo fibroso.

Tabela 2- Coeficientes de regressão (modelo $y_k = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{12} x_1x_2$) para os teores de glicose e dextrinas nos hidrolisados de gengibre, e rendimento do processo.

Parâmetros	-----Variáveis respostas-----		
	Glicose	Dextrina	Rendimento
β_0	81,45	0,305	56,46
β_1	8,40***	-0,07	5,82***
β_2	3,21	-0,311*	2,22
β_{11}	5,45*	0,110	3,80*
β_{22}	7,81**	0,166	5,42**
β_{12}	0,75	0,098	0,52
R^2	0,9330	0,7263	0,9327

β_{1x1} = Termamyl 2X (efeito linear); β_{2x2} = AMG 300L (efeito linear); β_{11x1x1} = Termamyl 2X (efeito quadrático); β_{22x2x2} = AMG 300L (efeito quadrático); R^2 = coeficiente de determinação; * $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$



LEONEL & CEREDA (1999), estudando o processo de hidrólise-sacarificação de farelo de mandioca, relatam que parte dos açúcares obtidos fica retida nas fibras após o processo de prensagem para obtenção do hidrolisado. Estes autores descrevem que no processo enzimático utilizando Termamyl 120L (0,5kg t⁻¹ amido) e AMG 300L (1,13L t⁻¹ amido), 26,02% dos açúcares obtidos ficaram retidos no resíduo e o rendimento do processo foi de 67,8%, sendo

considerados, no cálculo do rendimento, os açúcares retidos no resíduo.

De acordo com o modelo ajustado, os menores rendimentos de hidrólise da suspensão de gengibre são obtidos nas condições de baixa concentração de α -amilase e concentrações intermediárias de amiloglucosidase (Figura 2).

A necessidade de elevadas concentrações de enzimas no processo de hidrólise-sacarificação de

suspensão de gengibre pode ser devido à presença de significativa quantidade de fibras, o que dificulta a transferência de calor no reator e, conseqüentemente, afeta a atividade enzimática.

Outro fato a ser considerado são as características do amido deste rizoma. As propriedades da pasta do amido de gengibre, avaliadas pelo Rápido Visco Analisador (RVA) por LEONEL et al. (2005), mostraram temperatura de pasta (91,1°C) muito superior às observadas em amido de outras tuberosas como a batata (64,8°C) e mandioca (66,7°C) (LEONEL et al., 2002).

A quebra de viscosidade do amido de gengibre é próxima de zero, evidenciando elevada estabilidade térmica e mecânica, ou seja, em temperaturas elevadas e sob agitação mecânica, os grânulos deste amido resistem à quebra e, portanto, à redução de viscosidade (VIEIRA & SARMENTO, 2008; LEONEL et al., 2005). REYES et al. (1982) atribuíram esta elevada resistência do amido de gengibre à presença de forças de ligações homogêneas e a um elevado grau de associação entre os componentes deste amido, mantendo a estrutura granular, o que pode interferir na ação das enzimas, diminuindo o rendimento.

CONCLUSÃO

As concentrações de enzimas amilolíticas interferem no perfil e rendimento de carboidratos durante o processo de hidrólise-sacarificação de suspensão de gengibre, sendo necessárias concentrações elevadas de enzimas para a obtenção de maiores rendimentos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, N.G. **Aspectos econômicos da cultura do gengibre**. Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, SEAB, Departamento de Economia Rural, DERAL, 2007. 9p.
- AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS – AACC. **Approved methods of the American Association of Cereal Chemists**. 7.ed. rev. St. Paul, 1983. 1094p.
- BARROS NETO, B. et al. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 3.ed. Campinas: Unicamp, 2007. 480p.
- GARCIA, K. **Estado é o maior produtor e exportador de gengibre**. Um novo Espírito Santo. Secretária da Agricultura, Abastecimento, Aqüicultura e Pesca – SEAG. Disponível em: <<http://www.es.gov.br/site/noticias/show.aspx?noticiaId=99660156>>. Acesso em: 04 out. 2008.
- HERBS & SPICES, Important Spice. Ginger. **Herbs & Spices**. Disponível em: <<http://www.foodmarketexchange.com/datacenter/product/herb/detail/dc>>. Acesso em: 23 out. 2008.
- LEONEL, M.; CEREDA, M.P. Avaliação da celulase e pectinase como enzimas complementares no processo de hidrólise-sacarificação do farelo de mandioca para produção de etanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, p.113-117, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611999000100020&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 28 set. 2010.
- LEONEL, M. et al. Processamento da araruta (*Maranta arundinacea*) para extração e caracterização da fração amilácea. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.5, p.151-155, 2002. Disponível em: <<http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos/html/busca/PDF/v5nu093a.pdf>>. Acesso em: 22 fev. 2012.
- LEONEL, M. et al. Aproveitamento do gengibre (*Zingiber officinale*) de qualidade inferior como matéria-prima amilácea. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v.1, p.9-18, 2005. Disponível em: <<http://www.cerat.unesp.br/revistarat/volume1.php>>. Acesso em: 23 fev. 2012.
- LÉVÊQUE, E. et al. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, n.1, p.3-14, 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TG1-3Y6Y51S-1&_user=972052&_coverDate=01%2F31%2F2000&_alid=1478499248&_rdoc=3&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_zone=slit_list_item&_cdi=5241&_sort=r&_st=13&_docanchor=&view=c&_ct=115&_acct=C000049647&_version=1&_urlVersion=0&_userid=972052&md5=594e5ad9ead7fe9e2d39680e2afda5a7&searchtype=a>. Acesso em: 22 fev. 2012.
- MAAREL, M.J.E.C. et al. Properties and Applications of Starch-converting Enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v.94, p.137-155, 2002.
- NEGRELLE, R.R.B. et al. Análise prospectiva do agronegócio gengibre no estado do Paraná. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.4, p.1002-1028, 2005.
- OBEL, L.B. Putting enzymes to work in bakery applications. **Cereal Foods World**, v.46, n.9, p.396-399, 2001.
- REYES, F.G.R. et al. Characterization of starch from ginger root (*Zingiber officinale*). **Starch/Stärke**, v.34, n.2, p.40-44, 1982.
- SAS INSTITUTE INCORPORATED. **The SAS for Windows, release 9.1**. Cary, 2003. (NC 27513-2414, USA).
- SOMOGY, M. Determination of blood sugar. **Journal of Biological Chemistry**, n.160, p.69-73, 1945.
- SUVD, D. et al. Crystal structure of Bacillus stearothermophilus alpha-amylase: possible factors determining the thermostability. **Journal of Biochemistry**, v.129, p.461-468, 2001. Disponível em: <<http://jb.oxfordjournals.org/content/129/3/461.short>>. Acesso em: 27 set. 2010.
- TAVEIRA M.M. et al. Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) brasileiro: aspectos gerais, óleo essencial e oleoresina. Parte 1 – Aspectos gerais, óleo essencial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, p.64-69, 1997.
- VIEIRA, F.C.; SARMENTO, S.B. Heat-moisture treatment and enzymatic digestibility of Peruvian carrot, Sweet potato and Ginger starches. **Starch/Stärke**, v.60, p.223-232, 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/star.200700690>>. Acesso em: 28 set. 2010.
- ZANIN, G. M. et al. Brazilian bioethanol program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.84-86, p.1147-1161, 2000.