



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

NÁDIA CRISTIANE STEINMACHER

**XILANASES E EXTRUSÃO REATIVA NA MODIFICAÇÃO DE  
BAGAÇO DE MALTE PARA EMPREGO EM PANIFICAÇÃO**

---

Londrina  
2010

NÁDIA CRISTIANE STEINMACHER

**XILANASES E EXTRUSÃO REATIVA NA MODIFICAÇÃO DE  
BAGAÇO DE MALTE PARA EMPREGO EM PANIFICAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção de título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Victoria Eiras Grossmann

Londrina  
2010

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação -na-Publicação (CIP)**

S823x Steinmacher, Nádia Cristiane.  
Xilanases e extrusão reativa na modificação de bagaço de malte para emprego em  
panificação / Nádia Cristiane Steinmacher. – Londrina, 2010.  
114 f. : il.

Orientador: Maria Victória Eiras Grossmann.  
Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos,  
2010.

1. Xilanases – Teses. 2. Malte – Processos de extrusão – Teses. 3. Panificação –  
Teses. 4. Resíduos industriais – Teses. I. Grossmann, Maria Victória Eiras.  
II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de  
Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 664.6/.7

NÁDIA CRISTIANE STEINMACHER

**XILANASES E EXTRUSÃO REATIVA NA MODIFICAÇÃO DE  
BAGAÇO DE MALTE PARA EMPREGO EM PANIFICAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção de título de Doutor em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Maria Victoria Eiras Grossmann  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dra. Marta de Toledo Benassi  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dra. Adelaide del Pino Beléia  
UEL – Londrina – PR

---

Dra. Maria Brigida dos Santos Scholz  
IAPAR – Londrina – PR

---

Dra. Martha Zavariz de Miranda  
EMBRAPA

Londrina, 05 de março de 2010.

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico ao meu amado esposo Fernando e à minha filha Amanda, que são a concretização dos meus sonhos e verdadeira felicidade.*

*Dedico ao meu pai, Álvaro Steinmacher (in memoriam) que, diante dos obstáculos, nos passou um exemplo de luta e ensinou que superar as dificuldades é sabedoria. À minha mãe, Mirta Steinmacher, pelo exemplo de força e por nos mostrar que viver é uma arte. E aos meus irmãos, Douglas e Fernanda, pelo amor, união e todo apoio.*

*Nada disso teria acontecido se não fosse por vocês. Amo a todos. Muito obrigada!*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Maria Victoria Eiras Grossmann, por todo apoio e ensinamentos dados durante esses anos de convívio;

À Cervejaria Spoller, LCA Alimentos, e Novozymes Ltda, pelo fornecimento da matéria prima utilizada neste estudo;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de doutorado;

À coordenação e todos os professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos pelos ensinamentos;

À Sandra Rezende, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos;

Ao técnico Nelson Heitor Fuzinato, que sempre foi super prestativo e nunca mediu esforços para me ajudar;

Às técnicas Elza Youssef e Berenice, por todo o apoio;

Aos estagiários mais dedicados e companheiros, Fernando Honma, Altair Vinicius Gasparetto e Danielly Anibal, por me acompanharem mesmo quando os dias se tornavam longos demais;

Às minhas irmãs de Londrina, Juliana C. Lopes, Okçana Battini e Fernanda Nasraui, obrigada por serem minha segunda família;

Às minhas queridas amigas, Michele Rosset e Cristina Filgueiras Tostes. Se não fossem por nossas conversas e risadas, não teria graça.

STEINMACHER, Nádía Cristiane. **Xilanases e extrusão reativa na modificação de bagaço de malte para emprego em panificação**. 2010. 99 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

## Resumo

Com o aumento de políticas para reduzir a poluição ambiental, a maioria das indústrias vem se preocupando com fatores como reciclagem ou reaproveitamento dos resíduos gerados. O processo de cervejaria é característico por produzir grande volume de resíduo, denominados bagaço de malte, utilizado principalmente para alimentação animal. Este resíduo obtido após liquefação e sacarificação do malte no processo cervejeiro, é composto essencialmente por material hemicelulósico. O objetivo do trabalho foi modificar enzimaticamente este resíduo, associando a hidrólise com hemicelulases a um processo inovador de conversão em extrusor. Também, comparar o efeito dos tratamentos em pães, além de melhorar as características destes através da otimização do processo de panificação. Foram utilizados dois tipos comerciais de enzimas (Pentopan Mono BG® (EP) e Celluclast BG® (EC)), nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 3,0 e 5,0% em relação ao teor de hemicelulose do bagaço e um extrusor mono-rosca. Foram realizadas avaliações da modificação do bagaço de malte. Pães foram elaborados com farinhas compostas contendo 12% de bagaço de malte tratado (BT) ou não-tratado (BNT) Também foram testadas formulações contendo BNT com posterior adição direta das enzimas nas mesmas concentrações empregadas na extrusão reativa. Com base nas características dos pães resultantes e na produção de maior quantidade de resíduos de xilose um tratamento foi selecionado e o produto obtido foi aplicado em processo de otimização do processo de panificação. Foi aplicada a metodologia de superfície de resposta para avaliar os efeitos do tipo de mistura (forma lenta ou rápida de mistura da farinha de bagaço de malte), da quantidade de água adicionada à massa e do tempo de fermentação nas características dos pães. O processo biorreativo foi efetivo na modificação das arabinoxilanas, e dentre os tratamentos estudados, os processos de maior eficiência na obtenção de compostos de menor peso molecular foram com a enzima EC, nas concentrações de 5,0% e 1,0%. Pães desenvolvidos com BNT e adicionados de EP ou EC diretamente à massa apresentaram maior volume específico e menor dureza do que aqueles desenvolvidos com BT-EP ou EC, no processo padronizado de panificação. Sensorialmente não houve preferência dos provadores pelos pães desenvolvidos com diferentes tratamentos. Após otimizado o processo, a melhor condição encontrada foi a de elaboração de pães com a adição da farinha de bagaço de malte à massa de forma lenta, com quantidade de água adicionada de 72 mL e 90 minutos de tempo de fermentação. Houve pouca diferença entre os tratamentos avaliados nessas condições, e com base nisso, conclui-se que o processo de panificação interferiu na qualidade dos produtos obtidos. Assim, as vantagens conferidas pela modificação enzimática, em relação ao BNT, foram equiparadas pelo efeito positivo da modificação do processo de mistura.

**Palavras chave:** Resíduo industrial. Arabinoxilanas. Biorreator. Modificação enzimática. Panificação.

STEINMACHER, Nádia Cristiane. **Xylanases and reactive extrusion in spent grain modification to apply in bread.** 2010. 99 f. Thesis (Doctorate in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

### **Abstract**

With the increase of policies to reduce the environmental pollution, most of the industries are concerned about recycling or reuse of generated residues. The brewery processing industry produces large quantities of waste products, called spent grain, and its main application has been limited to animal feeding. This residue is left after separation of the wort during the brewing process and rich in hemicellulose. The aim of this work was obtain enzymatic modified treatment associated to a innovator process of conversion in extruder, and to compare the effects of this treatment in bread, and also to improve its characteristics through optimization of bakery process. Two kinds of commercial enzymes was used (Pentopan Mono BG® (EP) e Celluclast BG® (EC)) in 0,5; 1,0; 1,5, 3,0 e 5,0% about hemicellulose content of spent grain, and a single screw extruder. Evaluations of spent grain changes were accomplished. Bread were elaborated with composite flour with 12% treated (BT) or not-treated (BNT) spent grain content. Also, formulation of BNT with post addition of enzymes in the same concentration used in reactive extrusion. Based on bread characteristics and major xylose residues produced, a treatment was selected and used in bakery optimization process. Surface methodology was applied to evaluate the effects of mixture (slow or fast addition of spent grain flour); water quantity added to dough and proofing time, in bread characteristics. The bioreactive process was effective in arabinoxylan changes, and between studied treatments, the most effective treatment to obtain lower molecular weight were using EC enzyme in concentration 5,0 and 1,0%. Bread developed with BNT e added EC or EP to the dough showed higher specific volume e lower hardness than those developed with BT-EP or EC, in bakery standard process. Sensory evaluation doesn't show differences between panelists in bread developed with different treatments. After process optimization, the better condition observed was bread elaboration with slow addition of spent grain flour, 72 mL of water added and 90 min of proofing time. It was found little difference between treatments in this condition, and based on this, is conclude that bakery process influence on obtained product quality. This way, the vantages of enzymatic changes, related of BNT, were compared by positive effect of mixture process improvement.

**Keywords:** Industrial residues. Arabinoxylans. Bioreactor. Enzymatic changes. Baking.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

- Figura 1** – Grão de cevada e descrição das partes. Processo de transformação da cevada em cerveja .....24
- Figura 2** – Desenho esquemático representativo de parede celular de plantas monocotiledôneas, da família *Poaceae* .....29
- Figura 3** – Classificação de polissacarídeos não-amiláceos .....30
- Figura 4** – Arabinoxilana. (a) Xilose (Xil-ns); (b) Xilose unida à arabinose na posição O-3 e ácido ferúlico unido a arabinose na posição O-5 (Xil-3-O-s); (c) Xilose ligada a arabinose na posição O-2 (Xil-2-O-s); (d) Xilose unida a arabinose nas posições O-2 e O-3 (Xil-2-3-O-s) .....31
- Figura 5** – Estrutura dos ácidos Ferúlico e Coumárico .....31
- Figura 6** – Classificação das arabinoxilanas de acordo com sua solubilidade em água .....32
- Figura 7** – Representação teórica da estrutura da xilana vegetal e pontos onde as enzimas atuam. Ac, grupo acetil ; Arab, L-arabinofuranose ; MeGIA, ácido 4-O-metil-glicurônico ; Xil, D-xilose .....36

### CAPÍTULO III

- Figura 1** – Aparência dos pães elaborados com as formulações avaliadas sensorialmente. (a) FT+BNT; (b)FT+BT(EP1,0%); (c)FT+BNT+EP1,0%; (d) FT+BNT+EC5,0% .....60

### CAPÍTULO IV

- Figura 1** – Perfil de HPSEC-detector RI (índice de refração) da fração 0% de extratos solúveis de farinha de bagaço de malte .....75
- Figura 2** – Perfil de HPSEC-detector RI (índice de refração) da fração 65% de extratos solúveis de farinha de bagaço de malte .....76

<b>Figura 3</b> – Perfil de HPSEC-detector MALLS (espalhamento de luz laser multiângulos) da fração 0% de extratos solúveis de farinha de bagaço de malte .....	76
<b>Figura 4</b> – Perfil de HPSEC-detector MALLS (espalhamento de luz laser multiângulos) da fração 65% de extratos solúveis de farinha de bagaço de malte .....	77
<b>Figura 5</b> – Superfície de resposta de dureza de pães desenvolvidos com bagaço de malte (A) FT+BNT R (B) FT+BNT L; (C) FT+BNT-EP1,0% R; (D) FT+BNT-EP1,0% L; (E) FT+BT(EP1,0%) R; (F) FT+BT(EP1,0%) L. ....	83
<b>Figura 6</b> – Superfície de resposta de volume específico de pães desenvolvidos com bagaço de malte. (A) FT+BNT R (B) FT+BNT L; (C) FT+BNT+EP1,0% R; (D) FT+BNT+EP1,0% L; (E) FT+BT(EP1,0%) R; (F) FT+BT(EP1,0%) L. ....	84

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO III

- Tabela 1** – Codificação das formulações contendo farinhas compostas (farinha de trigo (FT) + farinha de bagaço de malte tratado ou não tratado (BT, BNT) em nível de 12% de substituição) .....49
- Tabela 2** – Quantificação de açúcares redutores (AR), índice de solubilidade total (IST) e capacidade de retenção de água (CRA) no bagaço de malte submetido a diferentes tratamentos .....53
- Tabela 3** – Quantificação de fibras alimentares solúvel (FAS), insolúvel (FAI) e total (FAT) .....54
- Tabela 4** – Parâmetros farinográficos da farinha de trigo e das farinhas compostas empregadas nos testes de panificação .....55
- Tabela 5** – Dureza e elasticidade dos pães desenvolvidos com farinhas compostas (12 % de bagaço de malte, tratado (BT) ou não tratado (BNT)) e diferentes formas de aplicação das enzimas .....57
- Tabela 6** – Cor e volume específico dos pães desenvolvidos com farinhas compostas (12 % de bagaço de malte, tratado (BT) ou não tratado (BNT)) e diferentes formas de aplicação das enzimas .....59
- Tabela 7** – Somatória dos valores obtidos por teste de ordenação – preferência das diferentes formulações de pães desenvolvidas com farinhas compostas (12 % de bagaço de malte, tratado (BT) ou não tratado (BNT)), e diferentes formas de aplicação das enzimas .....61

### CAPÍTULO IV

- Tabela 1** – Codificação das formulações das farinhas compostas (12 % de substituição em relação à farinha de trigo (FT)), em função do tipo de bagaço utilizado - tratado (BT) ou não tratado (BNT), do tipo e teor de enzima adicionado e do momento da adição .....70
- Tabela 2** – Variáveis independentes e diferentes níveis .....72
- Tabela 3** – Planejamento experimental completo (22) .....72

<b>Tabela 4</b> – Composição em monossacarídeos dos extratos aquosos de bagaço de malte não tratado (BNT) e tratado (BT) com diferentes tipos e concentrações de enzimas .....	74
<b>Tabela 5</b> – Parâmetros farinográficos da farinha de trigo (FT) e das farinhas compostas (FT+12% de bagaço de malte não tratado (BNT) e FT + 12 % de bagaço de malte tratado (BT)) empregadas nos testes de panificação .....	78
<b>Tabela 6</b> – Modelo de regressão e coeficiente de determinação para a dureza de pães elaborados com diferentes farinhas mistas, com diferentes condições de processo (R = mistura da farinha de bagaço de malte no processo rápido, L= mistura da farinha de bagaço de malte no processo lento) .....	80
<b>Tabela 7</b> – Modelo de regressão e coeficiente de determinação para o volume específico de pães elaborados com diferentes farinhas mistas, com diferentes condições de processo (R = mistura da farinha de bagaço de malte no processo rápido, L= mistura da farinha de bagaço de malte no processo lento) .....	80

## ABREVIações E SIGLAS

<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>CMC</b>	Carboximetil celulose
<b>FAI</b>	Fibra alimentar insolúvel
<b>FAS</b>	Fibra alimentar solúvel
<b>FAT</b>	Fibra alimentar total
<b>AR</b>	Açúcares redutores
<b>IST</b>	Índice de solubilidade total
<b>CRA</b>	Capacidade de retenção de água
<b>HPSEC</b>	Cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão
<b>RI</b>	refratômetro diferencial
<b>MALLS</b>	Sistema de espalhamento de luz laser multiângulos
<b>AX</b>	Arabinoxilanas
<b>AX-SA</b>	Arabinoxilanas solúveis em água
<b>AX-IA</b>	Arabinoxilanas insolúveis em água
<b>AX-ES</b>	Arabinoxilanas solubilizadas enzimaticamente
<b>XR</b>	Xilose residual
<b>EP</b>	Enzima Pentopan Mono BG®
<b>EC</b>	Enzima Celluclast BG®
<b>BT</b>	Bagaço de malte tratado enzimaticamente em extrusor como bioreator
<b>BNT</b>	Bagaço de malte não tratado
<b>FT+BNT</b>	Formulação de pão com farinha de trigo e bagaço de malte não tratado
<b>FT+BT(EP1,0%)</b>	Formulação de pão com farinha de trigo e bagaço de malte tratado enzimaticamente com 1,0% de enzima Pentopan Mono BG®
<b>FT+BT(EP5,0%)</b>	Formulação de pão com farinha de trigo e bagaço de malte tratado enzimaticamente com 5,0% de enzima Pentopan Mono BG®
<b>FT+BT(EC1,0%)</b>	Formulação de pão com farinha de trigo e bagaço de malte tratado enzimaticamente com 1,0% de enzima Celluclast BG®

- FT+BT(EC5,0%)** Formulação de pão com farinha de trigo e bagaço de malte tratado enzimaticamente com 1,0% de enzima Celluclast BG®
- FT+BNT+EP1,0%** Formulação de pão com farinha de trigo e bagaço de malte não tratado e adicionado de 1,0% de enzima Pentopan Mono BG® diretamente à massa
- FT+BNT+EP5,0%** Formulação de pão com farinha de trigo e bagaço de malte não tratado e adicionado de 5,0% de enzima Pentopan Mono BG® diretamente à massa
- FT+BNT+EC1,0%** Formulação de pão com farinha de trigo e bagaço de malte não tratado e adicionado de 1,0% de enzima Celluclast BG® diretamente à massa
- FT+BNT+EC5,0%** Formulação de pão com farinha de trigo e bagaço de malte não tratado e adicionado de 1,0% de enzima Celluclast BG® diretamente à massa

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	.....
<b>CAPÍTULO I – OBJETIVOS</b>	.....
<b>CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	.....
2.1 FABRICAÇÃO DA CERVEJA E GERAÇÃO DO BAGAÇO	.....
2.2 PRINCIPAIS INGREDIENTES DA CERVEJA	.....
2.2.1 Cevada	.....
2.2.2 Adjuntos	.....
2.2.3 Lúpulo	.....
2.3 O BAGAÇO DE MALTE	.....
2.3.1 Hemicelulose	.....
2.3.2 Arabinoxilanas	.....
2.4 UTILIZAÇÃO DO BAGAÇO	.....
2.5 HEMICELULOSE E PANIFICAÇÃO	.....
2.6 HEMICELULASES	.....
2.7 EXTRUSOR COMO BIOREATOR	.....
2.8 PROCESSOS DE PANIFICAÇÃO	.....
<b>CAPÍTULO III – BIOCONVERSÃO DE BAGAÇO DE MALTE, POR EXTRUSÃO REATIVA, E APLICAÇÃO EM PANIFICAÇÃO</b>	.....
Resumo	.....
1 Introdução	.....
2 Material e Métodos	.....
2.1 Material	.....
2.2 Métodos	.....
<i>Extração e quantificação de celulose e hemicelulose</i>	.....
<i>Determinação da atividade enzimática</i>	.....
<i>Processamento</i>	.....
<i>a. Hidrólise enzimática em extrusor</i>	.....
<i>b. Preparo das soluções enzimáticas</i>	.....
<i>Avaliação do efeito da extrusão reativa</i>	.....

a. Fibra Alimentar Insolúvel, Solúvel e Total (FAI, FAS e FAT) .....	
b. Açúcares redutores (AR) .....	
c. Índice de Solubilidade Total (IST) e Capacidade de Retenção de Água (CRA) ..	
Aplicação da farinha de bagaço de malte em pães .....	
Teste de panificação .....	
Avaliação das propriedades das farinhas e pães .....	
a. Propriedade de mistura das farinhas .....	
b. Perfil de textura .....	
c. Volume específico dos pães .....	
d. Cor do miolo dos pães .....	
e. Avaliação sensorial .....	
Análise dos resultados .....	
3 Resultados e Discussão .....	
Teor de celulose e hemicelulose no bagaço de malte .....	
Efeito da extrusão reativa .....	
Aplicação em panificação .....	
4 Conclusão .....	

**CAPÍTULO IV – OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PANIFICAÇÃO  
APLICADO EM FARINHAS MISTAS CONTENDO BAGAÇO DE MALTE  
MODIFICADO POR XILANASES DURANTE A EXTRUSÃO .....**

Resumo .....	
1 Introdução .....	
2 Material e Métodos .....	
2.1 Material .....	
2.2 Métodos .....	
Modificação enzimática do bagaço de malte em extrusor .....	
Extração de arabinoxilanas solúveis em água (AX-AS) .....	
Fracionamento de AX-SA .....	
Composição de monossacarídeos .....	
Homogeneidade da fração de arabinoxilana .....	
Aplicação da farinha de bagaço de malte em pães .....	
Propriedade de mistura das farinhas .....	

<i>Otimização do processo de panificação</i> .....	
<i>Avaliação dos pães</i> .....	
<i>a. Textura dos pães</i> .....	
<i>b. Volume específico dos pães</i> .....	
<b>3 Resultados e Discussão</b> .....	
<i>Efeito do processo bioreativo nos polissacarídeos presentes no bagaço de malte</i> ..	
<i>Aplicação em panificação e otimização do processo</i> .....	
<b>4 Conclusão</b> .....	
<b>CAPÍTULO V – CONCLUSÃO GERAL</b> .....	
<b>CAPÍTULO VI – SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	

## INTRODUÇÃO

Atualmente, há uma grande pressão política para reduzir a poluição ambiental decorrente de atividades industriais. Dessa forma, a grande maioria das indústrias vem se preocupando com fatores como reciclagem ou reaproveitamento dos resíduos gerados. Como consequência desta preocupação, os resíduos, antes considerados como poluentes, passam a ser indicados como matéria-prima para novos processos, com considerável valor agregado, na forma em que são obtidos, ou devido aos seus potenciais componentes.

Um caso específico são as indústrias cervejeiras, as quais geram, em grande escala, um subproduto sólido, derivado da mosturação, denominado bagaço de malte. Estima-se que, no Brasil, são gerados em torno de 2.000.000 toneladas de bagaço de malte disponíveis em todos os anos, já que a produção de cerveja é contínua ([www.grupocabrera.com.br/Bagaço.htm](http://www.grupocabrera.com.br/Bagaço.htm)).

O principal destino deste resíduo tem sido a alimentação de gado bovino, sendo aplicado experimentalmente em outras criações, como as de aves, suínos e peixes, com resultados positivos no aumento da produção e dos lucros, devido à redução de custos. Ao mesmo tempo, a aplicação para consumo humano tem sido estudada em produtos de panificação e biscoitos, especialmente devido à sua composição rica em fibras.

A composição química do bagaço varia de acordo com a variedade da cevada, o tempo de cultivo, condições de maceração e de mosturação na obtenção da cerveja mas, no geral, é um material considerado rico em fibras e proteínas, sendo as fibras oriundas das cascas do grão de cevada e, também, de algum material fibroso presente nos adjuntos. Essas fibras são compostas, geralmente, por celulose, lignina e hemiceluloses. As arabinoxilanas compõem o grupo das hemiceluloses, e estão presentes na concentração de 21% a 28% no bagaço de malte (MUSSATTO et al, 2006). São estruturas que podem se apresentar em duas formas distintas: insolúveis e solúveis.

O interesse de consumidores em produtos com elevado teor de fibras e seus benefícios vem aumentando cada vez mais. O pão é um alimento consumido por grande número de pessoas em todo o mundo, independente da

classe social, o que o torna um produto conveniente para a introdução de fibras alimentares na dieta.

Em panificação, as proteínas que constituem o glúten exercem o papel mais importante do processo, sendo responsáveis pela formação de matriz protéica, na qual todo o gás carbônico é retido, resultando no volume final dos pães.

A substituição de parte da farinha de trigo por outras, ricas em fibras, como a farinha de bagaço de malte, resulta em enfraquecimento da rede de glúten. O glúten torna-se menos extensível na presença de hemiceluloses, devido a possível interação destas com as proteínas formadoras do glúten (gluteninas e gliadinas) e, também, a diminuição do teor de glúten (ZGHAL et al, 1999). Uma possibilidade para corrigir as consequências negativas nas propriedades dos pães é a adição de hemicelulases na massa, solubilizando as cadeias de arabinosilanas e permitindo a formação de soluções viscosas, resultando na obtenção de pães com texturas macias (COURTIN; DELCOUR, 2002).

Este recurso já foi empregado no desenvolvimento de pães de trigo (COURTIN; DELCOUR, 2002); pães com alto teor de fibras e do tipo “sourdough” (KATINA et al, 2006); para melhorar as características durante o armazenamento (CABALLERO et al, 2007), e inclusive de pães com aplicação direta de bagaço de malte (STOJCESKA; AINSWORTH, 2008).

Neste trabalho, optou-se, como forma de tratamento, por um processo inovador, no qual o bagaço de malte foi modificado usando um extrusor como reator, utilizando duas enzimas comerciais (endoxilanas), e este produto hidrolisado aplicado em panificação.

A redação do presente trabalho foi dividida em capítulos. O capítulos 1 e 2 referem-se a Introdução e Objetivos do trabalho, respectivamente. O capítulo 3 – Revisão Bibliográfica - apresenta a obtenção e características do bagaço de malte, além da aplicação de produtos ricos em fibras em panificação e suas consequências.

Os capítulos 4 e 5 são artigos produzidos com os resultados obtidos durante este estudo, sendo que, no capítulo 4, fez-se a caracterização indireta da eficiência do processo biorreativo (extrusão aliada à hidrólise enzimática) e aplicação do bagaço de malte modificado em panificação e, no capítulo 5, estudou-se a composição monossacarídica dos componentes solúveis existentes antes e após o tratamento no extrusor e a otimização do processo de panificação.

O capítulo 6 apresenta a conclusão geral do trabalho, sintetizando as conclusões parciais obtidas nos capítulos 4 e 5, e no capítulo 7 estão sugestões para trabalhos futuros.

## **CAPÍTULO I**

## 1 OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo principal, o desenvolvimento de pães com substituição parcial de farinha de trigo por bagaço de malte não modificado ou hidrolisado por extrusão reativa usando endoxilanasas.

Os objetivos específicos foram:

- a) Caracterizar, através de análises físico-químicas, o bagaço fornecido por indústria cervejeira;
- b) Hidrolisar o bagaço, por extrusão reativa, utilizando endoxilanasas;
- c) Avaliar o efeito da ação enzimática sobre a fração fibra do bagaço;
- d) Desenvolver pães com adição de bagaço (modificado e não modificado por xilanasas) em substituição parcial à farinha de trigo;
- e) Desenvolver pães com farinha composta contendo bagaço sem modificar, adicionando endoxilanasas na formulação;
- f) Otimizar o processo de panificação para obtenção de pães com melhores características reológicas.

## **CAPÍTULO 2**

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 FABRICAÇÃO DA CERVEJA E GERAÇÃO DO BAGAÇO

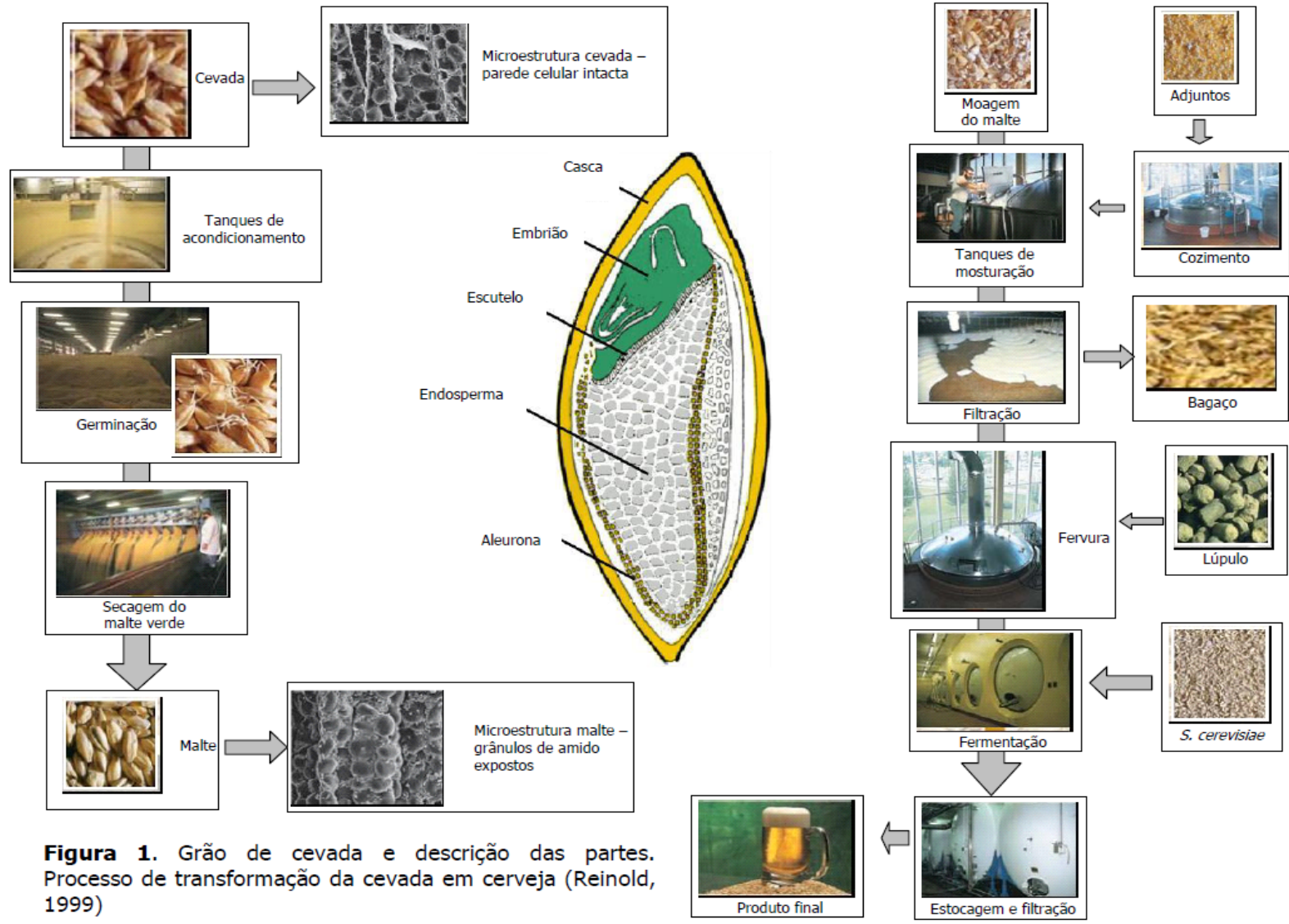
O processo de produção de cerveja, e conseqüente obtenção do bagaço, é iniciado com a seleção da cevada. A cevada destinada a cervejaria deve apresentar boa capacidade germinativa (acima de 95%). Para isso, o embrião deve ser forte, vigoroso e efetivamente germinativo. O teor protéico na cevada cervejeira não deve exceder um limite de 12% (COMISSÃO DE PESQUISA DE CEVADA, 2001).

Em seguida, a cevada é destinada ao processo de malteação, onde os grãos são macerados em água, aumentando, dessa forma, o conteúdo de umidade. A presença de água e oxigênio permitirá o desenvolvimento do embrião, dando início ao processo de germinação, pela ação das enzimas presentes na aleurona. Durante esse estágio, ocorrem reações enzimáticas e a quebra da parede celular. O grão é submetido ao processo de germinação durante aproximadamente quatro dias e, no final, pequenas raízes se formam nos grãos. Este grão germinado é denominado de “malte verde”. Após a germinação do grão, todo o excesso de água é removido e ocorre também o desprendimento das raízes. O malte, aparentemente, não apresenta diferenças físicas em relação à cevada não-malteada, porém, sua microestrutura é completamente alterada (SANTOS, 2001).

Para facilitar o acesso das enzimas ao amido durante a fabricação da cerveja, o malte deve ser moído. A moagem deve ser de tal forma que o endosperma fique exposto e as cascas permaneçam parcialmente intactas. Isso resultará em aumento da velocidade de filtração e maior facilidade de transformação do amido em glicose. Venturinni Filho e Nojimoto (1999) afirmam que a opção por moinho de rolo irá resultar no esmagamento do grão, sem grande fragmentação das cascas. A maioria das indústrias cervejeiras utiliza-se de adjuntos, como “grits” de milho ou arroz, os quais irão servir como fonte de açúcares. Os adjuntos devem passar por um processo de cozimento e, em seguida serem moídos, sendo adicionados ao malte em tanques de mosturação. Nessa etapa de obtenção do mosto, a temperatura interna dos tanques, contendo malte, adjuntos e água, é

elevada até um máximo de 72°C, e as enzimas contidas no malte, as  $\alpha$ -amilases, dão início à hidrólise do amido, a açúcares fermentáveis, como maltose e maltotriose, e não-fermentáveis, como dextrinas. Esse processo é acompanhado de agitação. Durante esse processo (mosturação), a água adicionada ao malte torna-se opaca, e esse líquido passa a ser denominado mosto. Para a separação do mosto das partes sólidas restantes do malte e adjuntos, o conjunto é submetido a um processo de filtração. As partes sólidas presentes irão formar um leito no interior no tanque de filtração e, ao término, algumas indústrias submetem o resíduo a lavagem com água em temperatura elevada no próprio tanque de filtração. Isso ocorre para certificar que todo o mosto foi aproveitado, e eventual espuma pode se formar. O resíduo obtido no processo de filtração é destinado a um filtro prensa seguinte, para remoção do excesso de água e retirado do processo, sendo denominado de bagaço.

O mosto é então destinado ao processo fermentativo, onde a levedura *Sacharomyces cerevisiae* será utilizada como fonte de enzimas para a conversão dos açúcares em etanol e produção de CO<sub>2</sub>. O caldo fermentado passa, então, por uma nova filtração e é destinado à estocagem (REINOLD, 1999) (Figura 1).



**Figura 1.** Grão de cevada e descrição das partes. Processo de transformação da cevada em cerveja (Reinold, 1999)

## 2.2 PRINCIPAIS INGREDIENTES DA CERVEJA

### 2.2.1 Cevada

A cevada pertence à classe das monocotiledôneas, família *Poaceae*, tribo *Triticeae* e ao gênero *Hordeum*. Sua característica taxonômica mais marcante é a inflorescência, formada por espiguetas alternadas em lados opostos de cada nó da superfície da ráquis da espiga. Há uma espiguetas tripla em cada nó, uma central e duas laterais e se as três espiguetas são férteis, formam-se espigas com seis fileiras de grãos e, quando somente a espiguetas central é fértil, formam-se duas fileiras de grãos por espiga (BOTHMER; JACOBSEN, 1985; NILAN; ULLRICH, 1993). De acordo com a posição da espiguetas, na maturação, distinguem-se os tipos *erectum* e *nutans*. No primeiro, a espiguetas madura mantém-se bem ereta, enquanto no segundo, ela se dobra para baixo. Para as cevadas destinadas às maltarias, o último tipo é o mais apreciado (HOSENEY, 1994).

Os principais constituintes dos grãos de cevada são: amido, fibra alimentar e proteína, na proporção de 60, 20 e 10% da matéria seca, respectivamente. As  $\beta$ -glucanas são um importante constituinte da fibra alimentar, e seu conteúdo tem sido relatado entre 3 a 7%. Os lipídios, cinzas e açúcares de baixo peso molecular são minoritários, constituindo cerca de 3, 2 e 4% da matéria seca, respectivamente (AMAN; NEWMAN, 1986; OSCARSSON et al, 1996; BHATTY, 1999; GUTKOSKI; PEDÓ, 2000).

Os constituintes não estão uniformemente distribuídos nas diferentes partes do grão. O pericarpo e a camada de aleurona são ricos em fibras alimentares, pentosanas e cinzas; o gérmen contém altos teores de lipídios, proteínas, açúcares e minerais, e o endosperma é constituído basicamente por amido, apresentando menores teores de proteínas, lipídios e cinzas, em comparação com as frações gérmen, pericarpo e aleurona (DE FRANCISCO, 2002).

Na cevada, os polissacarídeos insolúveis encontram-se no endosperma periférico, enquanto na parte central do grão estão os

polissacarídeos solúveis. Os níveis de  $\beta$ -glucanas são afetados tanto por aspectos genéticos quanto por fatores ambientais, porém a influência genética exerce papel essencial (BEBER, 1996).

As principais frações de proteínas de reserva em cevada são as hordeínas (prolaminas) e gluteninas (glutelinas), somando 35 a 55% e 35 a 45% do conjunto de proteínas de reserva, respectivamente (KENT, 1987; LINKO et al, 1989; SHERRY, 1993). As proteínas de reserva localizam-se nas células do endosperma em forma de inclusões, chamadas corpúsculos ou corpos protéicos. Estas constituem a fração mais importante dos cereais do ponto de vista qualitativo e quantitativo (SHEWRY, 1993; SGARBIERI, 1996). Geralmente, a quantidade de albuminas em cevada é relativamente baixa (3 a 5% da proteína total), e considerável quantidade de globulinas (10 a 20% da proteína total) ocorre no endosperma. As hordeínas são particularmente ricas em glutamina e prolina e tem baixo teor de lisina, aproximadamente 0,8% (SHEWRY et al, 1984).

Han e Schwarz (1996) caracterizaram as arabinoxilanas presentes em cevada, mosto e cerveja. Na cevada, as arabinoxilanas estão presentes em 4-8% do grão, distribuídos na aleurona e endosperma do grão. Os autores observaram que o processo de mosturação reduz em média 34% do teor total de polissacarídeos não-amiláceos (PNA), os quais, por sua vez, são constituídos por 48% de arabinose e xilose, 50% de glicose e 2% de outros açúcares. A fração insolúvel é composta por 64% de arabinose e xilose, 33% de glicose e 3% de outros açúcares. Durante a mosturação, apesar de haver redução da composição em PNA, provocada pela redução de resíduos de glicose, representados por cadeias de  $\beta$ -glucana, há aumento da concentração de arabinose e de xilose (17%), concluindo que grande parte das cadeias de  $\beta$ -glucana são solúveis em água, enquanto que as arabinoxilanas, formadas por resíduos de arabinose e xilose, são insolúveis.

### 2.2.2 Adjuntos

De acordo com o decreto nº 2314 de 1997 (BRASIL, 1997), que regulamenta a Lei Nº 8.918 (14 de julho de 1994) do Ministério da Agricultura

(BRASIL, 1994), é possível a substituição de até 15% do extrato malteado, desde que os adjuntos sejam de origem vegetal, e especificamente derivados de algum de um dos seguintes cereais ou da mistura dos mesmos: cevada, arroz, trigo, centeio, milho, aveia e sorgo.

Os adjuntos, quando adicionados ao malte, irão servir como fonte secundária de açúcares, necessários para o processo de fermentação. Cereais não-malteados são opções de utilização como complementos na fermentação, porém, uma operação de cozimento deve ser realizada previamente. A gelatinização do amido que ocorre durante esse processo de cocção irá facilitar a sua exposição, efetivando a ação das enzimas presentes no malte (PERPÈTE; COLLIN, 2000). No Brasil, pela facilidade ao acesso, as opções de adjuntos mais utilizadas são os “grits” de milho e de arroz, os quais além de serem de baixo custo, apresentam um alto conteúdo de amido. Xaropes de glicose ou de maltose, açúcar invertido ou caramelo também podem ser utilizados, dispensando o processo de sacarificação do amido.

### 2.2.3 Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma planta trepadeira cujas flores fêmeas apresentam grande quantidade de resinas amargas e óleos essenciais. São essas substâncias, as responsáveis pelo sabor e aroma característicos da cerveja. Assim como a quantidade adicionada na cerveja, a qualidade do lúpulo irá diferenciar as diversas marcas presentes no mercado. As variedades de lúpulo podem ser diferenciadas pela sua composição em óleos essenciais (JORGE; TRUGO, 2003).

## 2.3 O BAGAÇO DE MALTE

As fibras presentes no bagaço são as que compõem as cascas do grão de cevada e, também, algum material fibroso presente nos adjuntos. Podem ser representadas, geralmente, por celulose, lignina e hemiceluloses.

Em indústrias cervejeiras, o bagaço é constituído pelos resíduos originados durante o processo de obtenção do mosto, quando as enzimas contidas no malte degradam o amido em açúcar fermentável. Devido às diferenças de técnicas cervejeiras, há grande variação entre os constituintes do bagaço para cada indústria. Porém, quando se trata de uma única técnica de obtenção de cerveja, uma composição média pode ser estabelecida. O bagaço é composto por, aproximadamente, 24% de proteína, 21% de pentosanas, 12% de lignina, 25% de celulose, 11% de lipídios e 2% de cinzas (KANAUCHI et al, 2001).

### 2.3.1 Hemiceluloses

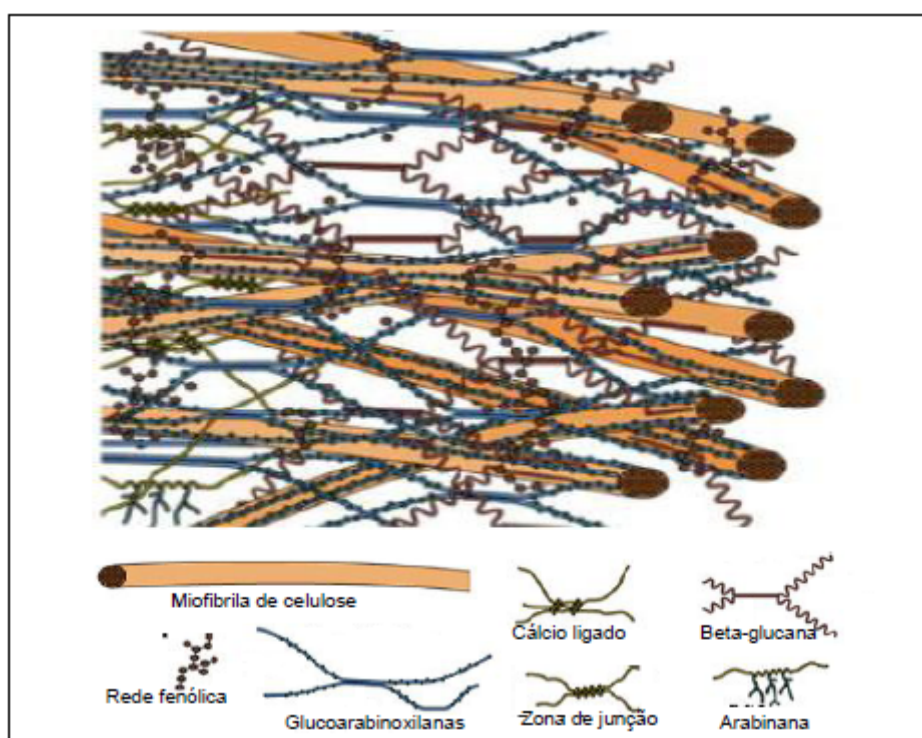
Hemiceluloses são heteropolissacarídeos, formados por diversos resíduos de D-xilose, D-manose, D-arabinose e D-galactose, assim como por ácidos urônicos, interligados entre si por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, formando uma cadeia principal da qual podem surgir ramificações laterais. A classificação se dá pela formação da cadeia, assim, diferentes denominações das hemiceluloses são dadas pela estrutura química, como por exemplo, xilana, galactomanana, arabinoxilana, entre outras. Esses polissacarídeos de cadeia ramificada ligam-se firmemente entre si e com cadeias de celulose, por pontes de hidrogênio em rede complexa (BIELY, 1985).

As hemiceluloses constituem cerca de 40% de todas as camadas da parede celular das plantas, onde se encontram intimamente associadas à celulose e lignina. A parede celular de plantas monocotiledôneas é constituída por unidades de celulose interligadas às (glucurono) arabinoxilanas, as quais constituem a hemicelulose principal. Apresentam-se, nesta estrutura, também, resíduos de ácido glucurônico e compostos fenólicos, os quais participam na

formação de ligações cruzadas entre os polissacarídeos (CARPITA; MCCANN, 2000).

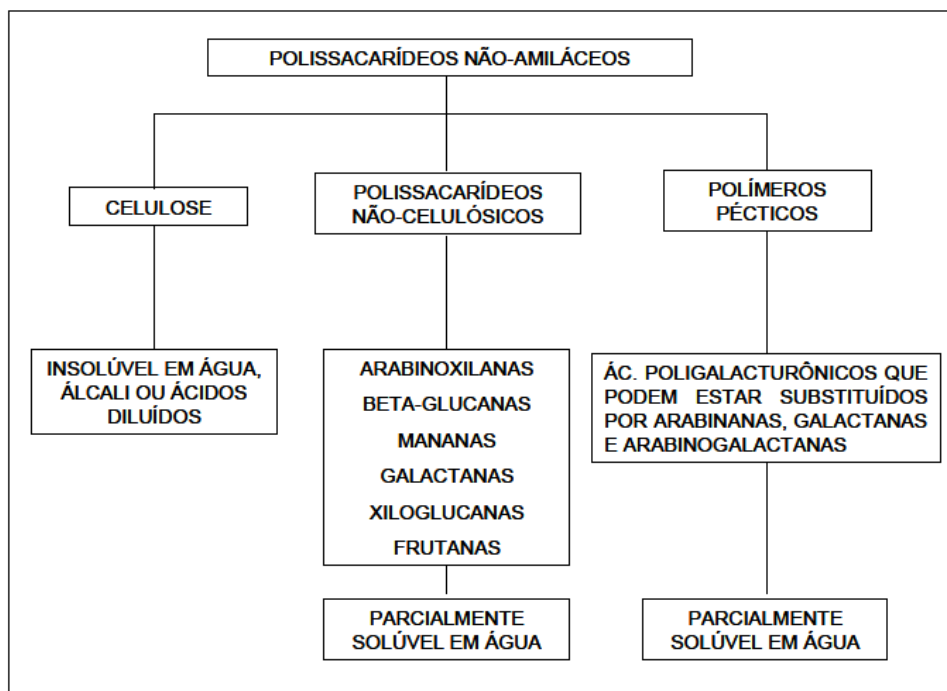
Dentre os polissacarídeos componentes das hemiceluloses, a xilana é o principal, sendo composta por resíduos de  $\beta$ -1,4 D-xilanopiranosil com ramificações de arabinosil e/ou acetil.

Na Figura 2, pode-se observar a estruturação da parede celular proposta por Carpita e McCann (2000).



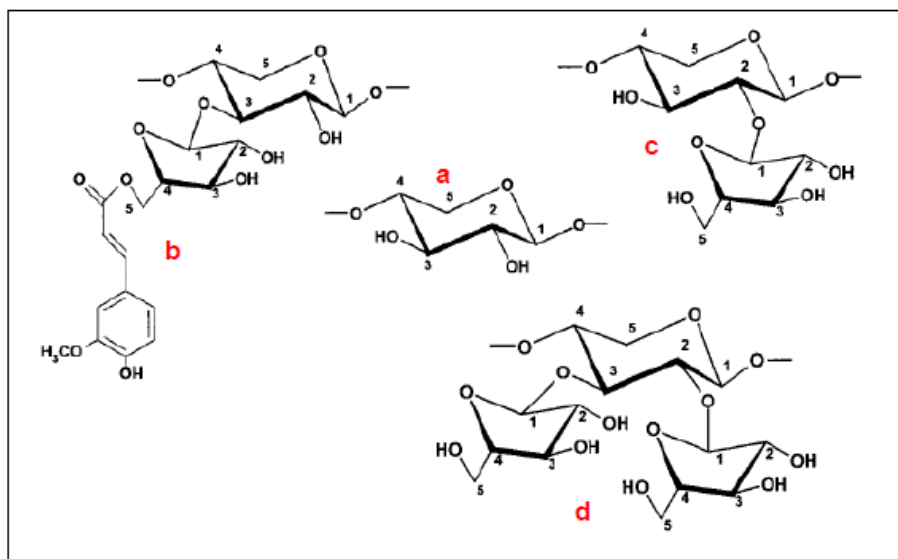
**Figura 2** – Desenho esquemático representativo de parede celular de plantas gramíneas, da família *Poaceae* (CARPITA; MCCANN, 2000).

As hemiceluloses (polissacarídeos não-celulósicos), juntamente com a celulose e polímeros pécticos, compõem o grupo dos polissacarídeos não-amiláceos. Uma classificação pode ser vista na figura 3.

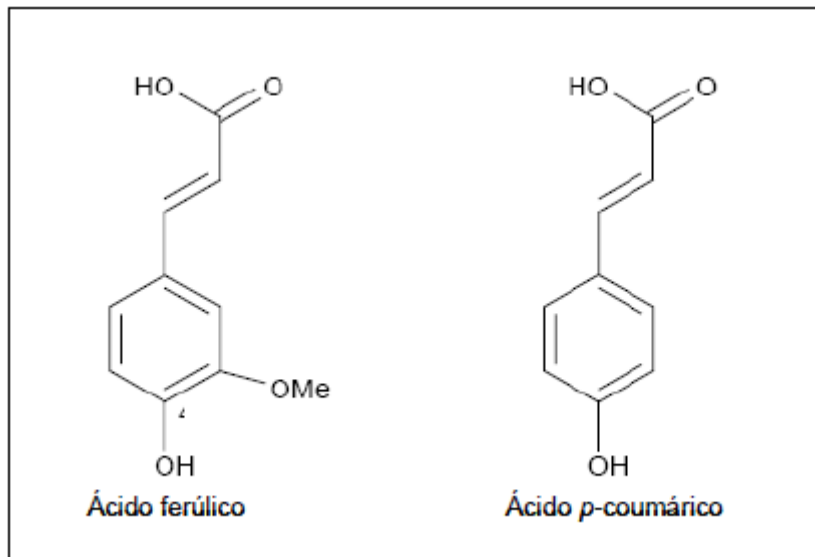


**Figura 3** – Classificação de polissacarídeos não-amiláceos (CHOCT; KOCHER, 2000).

As arabinoxilanas estão presentes na concentração de 21% a 28% do bagaço de malte (MUSSATTO; ROBERTO, 2005). São estruturas formadas por cadeias lineares de resíduos de xilose [(1-4)- $\beta$ -D- xilanopiranosil] e podem se apresentar de quatro formas distintas, dependendo do padrão de substituição e do grau de polimerização (VINKX; DELCOUR, 1996). A primeira forma é a cadeia de xilose sem nenhuma substituição (Xil-ns). Nas demais formas de cadeias de arabinoxilanas, os substituintes mais comuns são resíduos de arabinose ( $\alpha$ -L-arabinofuranose), que interagem com a cadeia de xilose nas posições O-2 e/ou O-3 (Xil-2-O-s ou Xil-3-O-s/Xil-2-3-O-s). (Figura 4). Resíduos de ácido ferúlico ou *p*-cumárico podem estar presentes na cadeia, interagindo na posição O-5 da arabinose (ISHII, 1997) (Figura 5). Outros microconstituintes comumente interligados à cadeia de xilana são os ácidos glicurônico e 4-O-metilglicurônico, os quais se ligam através do carbono dois (C-2), e esta interação é responsável pela solubilidade da arabinoxilana. O peso molecular da cadeia varia de acordo com as substituições, podendo estar dentro de 22.000 a 5.000.000 Da (DERVILLY et al, 2001).



**Figura 4** – Arabinoxilana. (a) Xilose (Xil-ns); (b) Xilose unida à arabinose na posição O-3 e ácido ferúlico unido a arabinose na posição O-5 (Xil-3-O-s); (c) Xilose ligada a arabinose na posição O-2 (Xil-2-O-s); (d) Xilose unida a arabinose nas posições O-2 e O-3 (Xil-2-3-O-s) (COURTIN; DELCOUR, 2002).



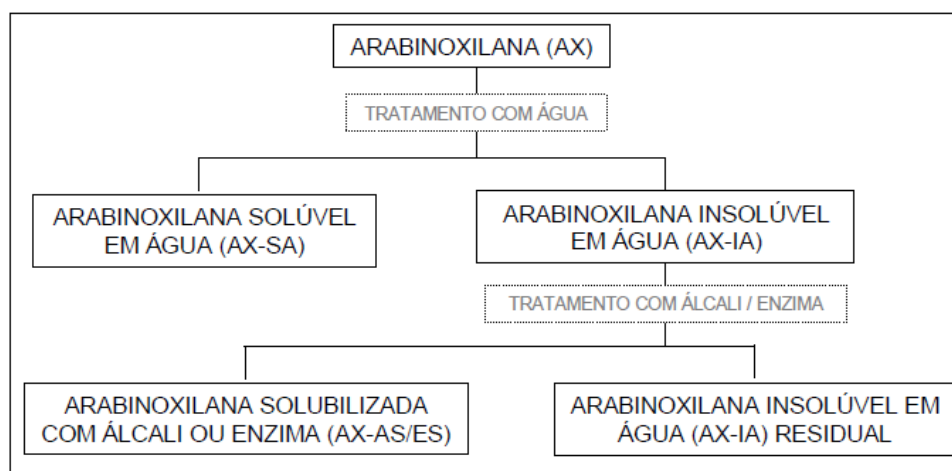
**Figura 5** – Estrutura dos ácidos ferúlico e cumárico (ISHII, 1997).

A arabinoxilana (AX) e a  $\beta$ -glucana são fibras presentes tanto na forma solúvel (AX-SA), quanto na insolúvel em água (AX-IA) (Figura 6). No trigo, 75% dos constituintes da parede celular são polissacarídeos não-amiláceos, e destes, 85% são arabinoxilana (COURTIN; DELCOUR, 2002). Destas

arabinoxilanas, 75% apresentam-se na forma insolúvel em água (MEUSER; SUCKOW, 1986), e o restante na forma solúvel.

Segundo Courtin e Delcour (2002), a solubilidade está relacionada com o número de resíduos de xilose presentes, quanto maior o grau de substituição, maior é a solubilidade da cadeia de arabinoxilana. Quando não há substituição das xiloses por arabinoses, pode ocorrer agregação das cadeias de arabinoxilana através de pontes de hidrogênio nas estruturas não-substituídas.

Cereais, como trigo, cevada e triticales contêm a mesma proporção de arabinoxilana solúvel em água nas formas: xilose não-substituída (Xil-ns), xilose com uma substituição (Xil-2-O-s ou Xil-3-O-s) e xilose duplamente substituída (Xil-2-3-O-s). Porém, a cevada é o único cereal que contém proporções significativas de arabinoxilana com substituição da xilose na posição O-2 (Xil-2-O-s) (OSCARSSON et al., 1996).



**Figura 6 –** Classificação das arabinoxilanas de acordo com sua solubilidade em água (COURTIN; DELCOUR, 2002).

Diferente da fração insolúvel da arabinoxilana (AX-SA), a fração solúvel não se apresenta ligada covalente ou não-covalentemente a outras estruturas, como celulose, proteína ou lignina, mas sim, interagindo fracamente com a própria parede celular, através do ácido ferúlico (SAULINER; THIBault, 1999).

A caracterização da estrutura das cadeias de arabinoxilanas pode ser realizada através de utilização de tratamentos com álcalis, precipitação alcoólica, técnicas como cromatografia a gás ou de troca iônica, espectroscopia de ressonância magnética, por metilação e degradação enzimática, entre outras (BRILLOUET et al., 1982; ENGLYST; CUMMINGS, 1984; BRILLOUET; JOSELEAU, 1987; DUPONT; SELVENDRAN, 1987; SCHOONEVELD-BERGMANS et al., 1999; COURTIN et al., 2000; COURTIN; DELCOUR, 2002; MANDALARIA et al., 2005).

A conformação dimensional dessas pentosanas é definida por quatro parâmetros:

- 1) Comprimento da cadeia de xilana;
- 2) Grau de substituição das xiloses;
- 3) Padrão de substituição ou a forma como as unidades de arabinose se ligam à cadeia; e
- 4) Interação do ácido ferúlico com outra molécula de arabinoxilana (COURTIN; DELCOUR, 2002).

## 2.4 UTILIZAÇÃO DO BAGAÇO

Apesar da maior parte do bagaço obtido industrialmente ser destinado à alimentação animal, a aplicação para consumo humano deste produto tem sido estudada, especialmente devido à sua composição rica em fibras (DUNG et al., 2002; DHIMAN et al., 2003).

A aplicação do bagaço na elaboração de biscoitos tipo “cookie” foi investigada por Öztürk et al., 2002. Após processos de moagem e de fracionamento do bagaço desidratado, removendo a fração composta de celulose, Dreese e Hosney, 1982, 1983; Finley e Hanamoto, 1980, avaliaram a sua adição em produtos de panificação. Em todos os estudos, uma seleção de fração a ser adicionada ao produto foi realizada. A razão disso é a grande quantidade de celulose presente neste resíduo, podendo diminuir a aceitação do produto final pelo consumidor.

Stojceska e Ainsworth (2008) incorporaram bagaço de malte em pães utilizando uma seleção de diferentes enzimas. Segundo os autores, apesar de aumentar consideravelmente a quantidade de fibras desses pães, houve dificuldade em encontrar a melhor quantidade a ser substituída da farinha de trigo, para que se obtivesse um pão com boa estrutura e volume específico ideal. A utilização de enzimas, como, por exemplo, *Celluclast* ou *Pentopan Mono*, melhoraram as características de textura da massa e o volume específico do pão.

## 2.5 HEMICELULOSES E PANIFICAÇÃO

Arabinosilanas são estruturas capazes de afetar expressivamente as características viscoelásticas das massas para panificação, assim como seus produtos finais, causando:

- a) Formação de suspensões viscosas com arabinosilana solúvel na presença de água, através de ligação cruzada entre arabinosilana e um ácido ferúlico adjacente (FIGUEROA-ESPINOZA; ROUAU, 1998), contribuindo positivamente para a estrutura externa (casca) do pão e também para o volume do produto;
- b) Estabilização de filmes protéicos através da diminuição da formação de bolhas pelo aumento da viscosidade da suspensão na presença de arabinosilanas (COURTIN; DELCOUR, 2002);
- c) Interação com o glúten (MICHNIEWICZ et al., 1991);
- d) Aumento indesejável da capacidade de retenção de água pela fração insolúvel, afetando a distribuição de umidade por toda a superfície da massa e, conseqüentemente, modificando as propriedades reológicas da rede de glúten, exigindo um tempo maior de mistura (COURTIN; DELCOUR, 2002). Michniewicz et al. (1991) concluíram que arabinosilanas insolúveis tem a capacidade de impedir a interação de ácido ferúlico com outras moléculas.

## 2.6 HEMICELULASES

A presença de arabinoxilanas tem grande influência na qualidade dos produtos finais, devido a isso, a aplicação de enzimas em produtos de panificação é amplamente estudada, objetivando sempre a formulação de produtos de panificação com boas propriedades reológicas, independente da adição de outros ingredientes com alto teor de fibras (TROGH et al., 2004; COURTIN; DELCOUR, 2002).

A capacidade de afetar significativamente a estrutura da arabinoxilana é a principal característica de enzimas hemicelulases, quebrando a cadeia aleatoriamente, liberando cadeias menores de oligômeros, xilobioses e xiloses (SUNGURTAS et al., 2004).

Como hemiceluloses são estruturas formadas por diversos resíduos de açúcares, para a sua degradação enzimas específicas são requeridas. Existem grupos de enzimas que degradam a xilana, liberando xilo-oligossacarídeos. O principal grupo é formado por endo  $\beta$ -1,4 xilanase (EC 3.2.1.8). A ação de exo-xilanases ( $\beta$ -xilosidases ou  $\beta$ -D-xilosídeo xilohidrolases) auxilia na completa degradação da cadeia principal, formando resíduos de xilo-oligômeros de baixo peso molecular. Para a hidrólise de hetero-oligômeros, presentes nas cadeias laterais,  $\alpha$ -glucuronidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e acetilesterase irão hidrolisar grupos substituintes (Figura 7) (HALTRICH et al., 1996).



**Figura 7** – Representação teórica da estrutura da xilana vegetal e pontos onde as enzimas atuam. Ac, grupo acetil ; Arab, L-arabinofuranose ; MeGIA, ácido 4-O-metilglicurônico ; Xil, D-xilose (BIELY, 1985)

O tipo de hemicelulase mais importante utilizada em panificação é a endoxilanase, a qual está naturalmente presente na aleurona, principalmente de trigo e cevada, porém seu nível de atividade é considerado baixo para atender às necessidades exigidas na produção de pães (COURTIN; DELCOUR, 2002).

As endoxilanases podem ser subdivididas em grupos, de acordo com a especificidade, seletividade de substrato, reação à inibição e mecanismo de catálise. Em panificação, a escolha pelo grupo ou família de endoxilanase vai sempre depender da qualidade do produto obtido, visando maior volume final. E para que isso ocorra, a enzima deve proporcionar solubilização suficiente da

fração insolúvel das arabinosilanas sem, no entanto, alterar a estrutura das cadeias solúveis. Dessa forma, há diminuição do peso molecular da estrutura insolúvel e, conseqüentemente, da sua capacidade de retenção de água, tornando-a solúvel e aumentando a viscosidade da massa (COLLINS et al., 2006).

## 2.7 EXTRUSOR COMO BIOREATOR

Processos de extrusão são comuns na produção de cereais matinais, amidos modificados e farinhas dextrinizadas ou pré-gelatinizadas. Condições de processo como temperatura, umidade e pressão podem alterar as características físico-químicas e de composição de um produto extrusado. Muitos estudos têm sido realizados para avaliar a capacidade de alteração de fibras em processos de extrusão.

Processos de extrusão combinam diversas operações unitárias, permitindo sua aplicação em misturas, cozimento, cisalhamento de polímeros, moldagem e enformagem de materiais. O processo comum de extrusão inclui altas temperaturas e pressão, e baixo tempo de duração (STOJCESKA et al., 2009).

Lecain et al. (1999) observaram que processos de extrusão servem como uma forma de modificar materiais contendo quantidades expressivas de fibra alimentar, principalmente polímeros como a pectina, e baixa quantidade de amido.

Østergård et al. (1989) concluíram que após o processamento por extrusão houve formação de fragmentos de amido resistente, acompanhado por um decréscimo da quantidade de amido.

A versatilidade dos extrusores fornece muitas possibilidades para seu uso, até mesmo como reatores químicos ou bioquímicos. Biopolímeros podem ser termomecanicamente modificados para diferentes fins ou então pré-tratados para subseqüentes aplicações. Reações enzimáticas podem ser paralisadas, permitindo maior vida de prateleira aos produtos; ou então, enzimas podem ser adicionadas ao processo, como por exemplo,  $\alpha$ -amilases

termoestáveis para hidrólise de amido e obtenção de xaropes, etanol ou aplicação em processos fermentativos (LINKO et al., 1982).

Lee et al. (2009) avaliaram o efeito da extrusão na sacarificação de biomassa de madeira e concluíram que processos contínuos de extrusão oferecem opção prática e de grande uso para processos em larga escala, devido ao fato de permitir excelente controle de temperatura e alta capacidade de conversão, além de adaptabilidade a diferentes processos de modificação.

Govindasamy et al. (1997) utilizaram um extrusor monorosca como bioreator na gelatinização e liquefação de amido de sagu *in natura*. Os autores observaram que fatores como quantidade de água adicionada e concentração enzimática foram as variáveis mais relevantes no processo. A comprovação da hidrólise foi feita por análises de aumento da solubilidade em água.

Não se tem conhecimento de estudos realizados em extrusão reativa com endoxilanasas em bagaço de malte para uso em panificação.

## 2.8 PROCESSOS DE PANIFICAÇÃO

Para obtenção da massa de pão um trabalho mecânico é exigido, mas modificações químicas da farinha também são de grande importância. Inicialmente faz-se uma mistura dos ingredientes e, a seguir, passa-se para um período de fermentação, durante o qual ocorrerão as principais mudanças nas propriedades físico-químicas dos polímeros, principalmente das proteínas presentes na farinha de trigo (BROWN, 1993).

Embora algumas proteínas sejam solúveis em água, são as proteínas insolúveis as responsáveis pela conversão de farinha e água em uma massa coesiva (WEEGELS et al., 1996). Quando a massa está desenvolvida, as proteínas, complexadas com lipídios e carboidratos, formam uma massa viscoelástica capaz de encapsular o ar, os grânulos de amido e, em alguns casos, pequenas quantidades de farelos (BLOKSMA, 1990).

Um desenvolvimento ideal do glúten pelo processo de mistura da massa é vital para a obtenção de massa com boa qualidade, caso contrário, o

produto final adquire uma consistência pesada, resultante da agregação insuficiente dos polímeros presentes no glúten (ZGHAL et al., 1999).

Água e farinha são os ingredientes mais importantes de uma receita de pão, já que afetam marcadamente a textura dos produtos. Uma quantidade ideal de água, avaliada por farinografia, adicionada à receita resulta em pães com textura desejável, maior quantidade de bolhas de CO<sub>2</sub> no miolo e uma casca mais espessa. Enzimas naturalmente presentes no trigo são responsáveis pela liberação de açúcares a partir do amido, os quais servirão de substrato para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* iniciar a fermentação, convertendo o açúcar em álcool e CO<sub>2</sub>. Durante o aquecimento, o vapor d'água e o gás carbônico se expandem, impedindo aquecimento excessivo da casca do pão. Para iniciar o processo de fermentação e conferir coloração agradável ao produto, açúcar é adicionado à receita. Sal é adicionado para fortalecer a rede de glúten e controlar a expansão da massa, e a gordura permite melhor maquinabilidade da massa. Outros ingredientes como ovos, leite e aditivos específicos, podem ser adicionados com funções específicas (MONDAL; DATTA, 2008).

As condições de processo são de vital importância para obtenção de um produto com boa qualidade. A transformação dos ingredientes em massa de panificação depende de três operações de processo (KENT; EVERS, 1994):

- a) Mistura e desenvolvimento da massa (mistura e fermentação);
- b) Formação de uma estrutura aerada na massa (modelagem, crescimento da massa e assamento);
- c) Estabilização da estrutura porosa pela alteração da configuração molecular da rede de glúten através da aplicação de calor (assamento).

Estudos já foram realizados para avaliar o efeito de farinhas compostas nas características reológicas de pães, assim como o nível de substituição da farinha de trigo observando a redução do volume específico e modificação da textura destes pães. No trabalho de Stojceska e Ainsworth (2008), com farinha composta com bagaço de malte, pode-se observar que a substituição de até 30% da farinha de trigo e a inclusão de enzimas específicas resultou em pães com volume específico aumentado, em relação ao controle, e textura agradável.

Parâmetros de processo e ingredientes em pães com farinha composta foram avaliados no estudo de Flander et al. (2007). Fatores como tempo e temperatura de fermentação e também de assamento apresentaram efeito significativo na dureza e no volume específico dos pães. Além disso, o tempo de mistura da massa também influenciou na dureza do produto.

## CAPÍTULO III

# BIOCONVERSÃO DE BAGAÇO DE MALTE POR EXTRUSÃO REATIVA E APLICAÇÃO EM PANIFICAÇÃO

## Resumo

O processo de cervejaria industrial é caracterizado por produzir grandes quantidades de resíduo, denominado bagaço de malte, proveniente do processo de mosturação e utilizado principalmente para alimentação animal. O objetivo deste trabalho foi viabilizar a utilização do bagaço de malte, propondo duas formas de utilização. A primeira, modificando enzimaticamente o bagaço de malte associando a hidrólise a um processo de bioconversão em extrusor (BT), seguido da comparação do efeito dos tratamentos em panificação. Foram utilizados dois tipos comerciais de enzimas, Pentopan Mono BG® (EP) e Celluclast BG® (EC), e foram realizadas avaliações da modificação do bagaço de malte. A segunda forma de utilização foi na elaboração de pães com bagaço de malte não-tratado (BNT), com posterior adição direta de enzimas nas mesmas concentrações. O processo de bioconversão foi eficiente na modificação da estrutura das arabinoxilanas, permitindo a formação de arabinoxilanas solúveis em água (AX-SA). Houve aumento de açúcares redutores, indicando aumento na produção de xilose residual e no índice de solubilidade em água. O conteúdo de fibras solúveis aumentou de acordo com o acréscimo da concentração de enzima aplicada em extrusão ao bagaço de malte. Pães desenvolvidos com BNT e adicionados de EP ou EC diretamente à massa, apresentaram maior volume específico e menor dureza do que aqueles desenvolvidos com BT e EP ou EC. Sensorialmente não foi observada diferença pelos provadores entre os pães desenvolvidos com diferentes tratamentos.

**Palavras-chave:** Aproveitamento de resíduo de cervejaria. Hidrólise enzimática. Arabinoxilanas. Panificação.

## 1 Introdução

Com o surgimento de políticas visando à redução da poluição ambiental, a maioria das indústrias vem se preocupando com fatores como reciclagem ou reaproveitamento dos resíduos gerados. Em consequência disso, os resíduos industriais, antes considerados poluentes, passaram a ser indicados como matéria-prima para novos processos. Um caso específico são as indústrias cervejeiras, as quais geram em grande escala subprodutos sólidos, derivados da mosturação e denominados de bagaço, característico por ser um material rico em fibras e proteínas (Mussatto, Dragone & Roberto, 2006). As fibras provêm das cascas do grão de cevada e também dos adjuntos, e são constituídos,

geralmente, por celulose, lignina e hemiceluloses. As arabinoxilanas, que compõem o grupo das hemiceluloses, representam aproximadamente 30% desta classe (Mussatto & Roberto, 2005).

Arabinoxilanas são estruturas formadas por cadeias lineares de resíduos de xilose [(1-4)- $\beta$ -D-xilanopiranosil)], podendo apresentar resíduos de arabinose ( $\alpha$ -L-arabinofuranose) como substituintes (Vinkx & Delcour, 1996). Segundo Courtin & Delcour (2002), a solubilidade está relacionada com o número de resíduos de xilose presentes; quanto maior o grau de substituição, maior a solubilidade. Quando não há substituição das xiloses por arabinoses, pode ocorrer agregação das cadeias de arabinoxilana através de pontes de hidrogênio.

A capacidade de afetar notavelmente a estrutura da arabinoxilana é a principal característica das hemicelulases. A endo  $\beta$ -1,4 xilanase (EC 3.2.1.8) compõem o principal grupo de enzimas envolvidas na degradação da xilana. Trata-se de uma endo-enzima que degrada, aleatoriamente, a cadeia principal de xilana, liberando xilo-oligossacarídeos e que tem diversas aplicações industriais, como por exemplo, em panificação (Sungurtas, Swanston, Davies & McDougall, 2004).

Na panificação, as proteínas que constituem o glúten exercem um importante papel no processo, sendo responsáveis pela formação de uma matriz, na qual a maior parte do gás carbônico é retido, resultando no volume final dos pães. A substituição de parte da farinha de trigo por outras, com alto teor de fibras, resulta em enfraquecimento da rede de glúten. Esta se torna menos extensível na presença de hemiceluloses, devido a possível interação dos seus constituintes com as proteínas formadoras do glúten, glutenina e gliadina, e também a diminuição do teor de glúten. Ambos os fatores podem ser minimizados pela adição de hemicelulases, solubilizando as cadeias de arabinoxilanas e permitindo a formação de soluções viscosas, resultando na obtenção de pães com texturas macias (Wang, van Vliet & Hamer, 2004).

Em estudos realizados por Sangnark & Noomhorm (2004), as hemicelulases foram adicionadas diretamente à massa do pão, sendo que processos de modificação de fibras normalmente ocorrem a partir de tratamentos químicos, gerando grande volume de resíduos.

O objetivo deste trabalho foi viabilizar a utilização do bagaço de malte, propondo diferentes formas de utilização. O processo de extrusão

associado ao tratamento enzimático utilizado neste estudo foi proposto, com o objetivo de permitir a hidrólise dos compostos em um processo mais rápido e sem geração de efluentes. Foram avaliadas as modificações físico-químicas ocorridas no bagaço de malte pela ação combinada de tratamento enzimático e processo de extrusão, e os impactos destas modificações nas características de pães elaborados com este ingrediente.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Material

Utilizou-se bagaço de malte fornecido pela Cervejaria Spoller (Londrina, PR, Brasil), contendo, em cada 100g,  $22,40 \pm 0,35$  g de proteína e  $67,90 \pm 0,25$  g de fibra alimentar ( $3,53 \pm 0,25$  g de fibra solúvel e  $64,37 \pm 0,003$  g de fibra insolúvel).

Para o tratamento enzimático foram empregadas duas enzimas comerciais, cedidas pela Novozymes Latin America Ltda (Araucária PR, Brasil): Pentopan Mono BG® (codificada como EP) e Celluclast BG® (EC). Pentopan Mono BG® é uma endo- $\beta$ -1,4-xilanase (pentosanase) de *Thermomyces lanuginosus*, produzida pela fermentação submersa de *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado, com faixa de atuação ótima em pH 4 - 6 e temperatura até 75°C, com atividade de 2500 UXF-T/g (unidades de xilanase fúngica - em trigo/g). Celluclast BG® é uma mistura de enzimas, contendo celulase, além de xilanase e  $\alpha$ -amilase. É obtida a partir de *Trichoderma reesei* e apresenta atividade enzimática expressa como celulase de 3500 UEG/g (unidades de endoglucanase/g).

Para a análise de fibras foram empregados os kits da Megazyme (Megazyme International Ireland Limited, Wicklow, Irlanda).

Testes de panificação foram realizados com farinha de trigo (proteína, 15,6g/100g; fibra alimentar g/100g (b.s.) características alveográficas W,  $322 \times 10^{-4}$  J; P/L, 2,10; P, 133 mm; L, 62 mm), fornecida pelos moinhos LCA Ltda. (Sertãoópolis, PR), e demais ingredientes (açúcar, sal, gordura vegetal

hidrogenada, fermento biológico instantâneo, emulsificante SSL) adquiridos no comércio local.

## 2.2 Métodos

### *Extração e quantificação de celulose e hemicelulose*

A quantificação dos teores de celulose e hemicelulose foram realizadas a partir de 500mg de bagaço de malte moído. Os açúcares solúveis foram removidos por lavagens consecutivas com solução de etanol (80° GL), seguida de centrifugação (8000 x g, 15 min, 5°C) e secagem (60°C, 12 h). O amido residual foi extraído com 20 mL de dimetil-sulfóxido (90mL/100mL) (DMSO) por 24 h, e o material foi lavado por três vezes com água destilada, centrifugado (8000 x g, 15 min, 5°C) e seco (60°C, 12 h). O material obtido foi adicionado de 20mL solução de oxalato de amônio (0,5g/100mL) por três vezes, centrifugado (8000 x g, 15 min, 5°C) e seco (60°C, 12h) para a remoção da pectina. Ao produto obtido desta extração, adicionou-se solução de NaOH 0,1mol/L contendo NaBH<sub>4</sub> (3mg/mL), permanecendo sob agitação por uma hora para ser neutralizado. A mistura foi centrifugada (8000 x g, 15 min, 5°C). Ao precipitado foi adicionado solução de NaOH 4mol/L contendo NaBH<sub>4</sub> (3mg/mL) e o processo foi repetido. De ambas as extrações, os sobrenadantes foram liofilizados, pesados e considerados como hemicelulose. Para a remoção da lignina, em 50mg do precipitado obtido na fração NaOH 4mol/L, foi adicionado reagente de Updegraff (5g ácido nítrico; 15g ácido acético em 100 mL de água destilada), sendo mantido a 100°C por 90 minutos, centrifugado (8000 x g, 15 min, 5°C) e o sobrenadante foi liofilizado, correspondendo à fração celulósica.

### *Determinação da atividade enzimática*

A atividade enzimática de celulase para a enzima EC foi avaliada segundo metodologia proposta por Mandels, Hontz & Nystrom (1974), utilizando como substrato carboximetil celulose (CMC) e glucose como padrão. A atividade de xilanase (enzima EP) foi avaliada segundo Bailey, Biely & Poutanen (1992),

usando solução de xilana de Birchwood (1g/100mL de água destilada), como substrato, e xilose como padrão. As quantidades de açúcares redutores produzidas, expressas em glicose ou xilose, foram determinadas pelo método de Somogyi e Nelson (Nelson, 1944). Uma unidade de atividade enzimática catalítica (katal) foi definida como a quantidade de enzima que libera um mol do açúcar redutor correspondente por segundo, a 40°C .

### *Processamento*

#### ***a. Hidrólise enzimática em extrusor***

Em 500g de bagaço (umidade 50g/100g de material) foram adicionados 30 mL de solução tampão acetato de sódio pH 5,0, contendo enzima específica em concentração pré-definida, e o teor de umidade foi padronizado para 65g/100g. A mistura foi homogeneizada e mantida a 50°C por uma hora antes da extrusão, em recipiente fechado, em estufa com circulação de ar.

Foi utilizado extrusor Cerealtec CT L15 (São Paulo-SP), monorroscas, com canhão de 420 mm de comprimento e 19,4 mm de diâmetro, parafuso com razão de compressão de 2:1 e matriz de 6 mm de diâmetro. A velocidade do parafuso (100 rpm) e a vazão de alimentação (90 g/min) foram mantidas constantes. As temperaturas das zonas 1, 2 e 3 foram mantidas a 50°C, enquanto que a da última zona foi mantida a 100°C, com o intuito de inativar as enzimas. As condições foram definidas em testes preliminares e todos os tratamentos foram realizados sob as mesmas condições, em duplicata e aleatoriamente.

Após a hidrólise, os extrusados foram secos em estufa com circulação de ar (60°C/12 h), quebrados em triturador de alimentos marca Vithory (Mecânica Vithory, São Paulo, Brasil) (1/2 HP; rotação de 3740 rpm), para redução da granulometria, e moídos em moinho de facas com refrigeração e acoplado a um termostato e medidor de rotação (Tecnal, modelo TE 631/2, São Paulo, Brasil).

As farinhas obtidas foram codificadas e armazenadas a 4°C em potes hermeticamente fechados, até o momento de realização das análises.

### ***b. Preparo das soluções enzimáticas***

As concentrações adicionadas das enzimas foram correspondentes a 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 3,0 e 5,0 g/100g de hemicelulose presente no bagaço., As enzimas foram solubilizadas em solução tampão acetato de sódio (2,89g acetato de sódio + 0,89mL ácido acético glacial em 100mL água destilada), pH 5,0.

#### *Avaliação do efeito da extrusão reativa*

### ***a. Fibra Alimentar Insolúvel, Solúvel e Total (FAI, FAS e FAT)***

Os teores de FAI, FAS e FAT foram avaliados de acordo com a metodologia 32-07 da AACC (1995), com o intuito de investigar se houve diferença na degradação de compostos insolúveis (FAI) pela ação da hidrólise enzimática e/ou da extrusão, com conseqüente aumento de produtos solúveis (FAS).

### ***b. Açúcares redutores (AR)***

Os açúcares redutores foram determinados para se observar a produção de xilose residual resultante da ação enzimática. Um extrato aquoso foi obtido a partir de 2g de amostra em 50mL de água destilada, mantido a 65°C por 30 min. Após filtração, os extratos foram transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Diluição 1:2 foi obtida de cada extrato e os açúcares redutores quantificados pelo método colorimétrico de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944), utilizando xilose como padrão, para pentoses.

### ***c. Índice de Solubilidade Total (IST) e Capacidade de Retenção de Água (CRA)***

A capacidade de retenção de água (CRA) foi determinada de acordo com Anderson, Conway, Pfeifer & Griffin (1969), adicionando 3g de amostra em 30mL de água destilada (30°C) (1), mantidos sob agitação (30 min) e

centrifugados (8000xg, 15 min, 4°C). A massa de sólidos obtida no precipitado foi pesada (2) e seca (60°C, 12 horas) (3), e o valor foi calculado a partir da equação:

$$\text{CRA} = \frac{\text{Massa do precipitado (2)}}{\text{Massa inicial de amostra (1) - Sólidos presentes no precipitado (3)}}$$

O índice de solubilidade total (IST) foi avaliado a partir de 3g de amostra em 30mL de água destilada (30°C) (1), mantidos sob agitação (30 min) e centrifugados (8000xg, 15 min, 4°C). A massa de sólidos obtida no precipitado foi pesada (2) e seca (60°C, 12 horas) (3), e o volume do sobrenadante foi quantificado (4). IST foi definido como:

$$\text{IST} = \frac{\text{Sólidos presentes no sobrenadante} \times \text{Quantidade de líquidos totais (LT)} \times 100}{\text{Massa inicial de amostra (1)}}$$

$$\text{LT} = \text{Massa do precipitado (2) - sólidos presentes no precipitado (3) + Volume do sobrenadante (4)}$$

#### *Aplicação da farinha de bagaço de malte em pães*

Estudos preliminares foram realizados e foi estabelecido o nível de 12g/100g de substituição da farinha de trigo por farinha de bagaço de malte, como o maior nível possível. Após avaliação do processo de hidrólise em extrusor, quatro tratamentos foram selecionados e as farinhas resultantes aplicadas na formulação de pães. Para efeito de comparação, pães foram também produzidos com emprego de bagaço de malte não tratado (BNT) adicionando diretamente à massa as mesmas concentrações de enzima dos tratamentos selecionados. Os tratamentos foram codificados de acordo com a Tabela 1.

**Tabela 1** – Codificação das formulações de pães contendo farinhas compostas (farinha de trigo (FT) + farinha de bagaço de malte tratado (BT), ou não tratado (BNT), em nível de 12% de substituição).

<b>Codificação<sup>a</sup></b>	<b>Descrição</b>
FT+BNT	Formulação com farinha de bagaço de malte sem tratamento (Controle)
FT+BT(EP1,0%) FT+BT(EP5,0%) FT+BT(EC1,0%) FT+BT(EC5,0%)	Formulações com farinha de bagaço de malte tratada enzimaticamente em extrusor
FT+BNT+EP1,0% FT+BNT+EP5,0% FT+BNT+EC1,0% FT+BNT+EC5,0%	Formulações com farinha de bagaço de malte sem tratamento e adição de enzima diretamente na massa

<sup>a</sup> EP, enzima Pentopan Mono BG®; EC, enzima Celluclast BG®.

### *Teste de panificação*

Os testes de panificação foram realizados, em duplicata, de acordo com a metodologia proposta por El-Dash (1978), com algumas modificações. A formulação utilizada foi padronizada para 300g de farinha composta (264g de farinha de trigo e 36g de farinha de bagaço de malte), açúcar (21g), sal (5,25g), gordura vegetal hidrogenada (6g), fermento biológico seco (3,75g), emulsificante SSL (estearoil-2-lactil lactato de sódio) (1,5g) e conservador propionato de cálcio (0,6g), sendo as quantidades dos ingredientes calculadas em relação à massa da farinha composta. A quantidade de água para cada formulação foi definida em farinógrafo Brabender.

A mistura da massa foi realizada em batedeira Oster (Mix Master OS2700, Sunbeam Products Inc.) com 550 watts de potência, e os ingredientes foram misturados em duas etapas, na seguinte ordem: farinha composta, açúcar, sal, gordura, emulsificante, conservador e água (4°C), sob velocidade alta, por 5 minutos, seguida de adição do fermento e, quando específico da formulação, adição da enzima, sendo esta segunda mistura realizada sob velocidade lenta, por 5 minutos. Após o término da mistura, fez-se um intervalo de 10 minutos de descanso e três amostras de 100g de massa foram colhidas, passadas em

cilindro com abertura de aproximadamente 3 mm por duas vezes, modeladas manualmente e enformadas em formas de 80mm de comprimento e 40mm de largura. A fermentação foi realizada em ambiente controlado (80% UR, 37°C), por 60 minutos. O assamento foi realizado a 220°C por 30 minutos.

Os pães obtidos foram resfriados a temperatura ambiente, embalados em sacos de polietileno e armazenados à temperatura ambiente em local seco e arejado, por 24, 96 e 120 horas.

### *Avaliação das propriedades das farinhas e pães*

#### **a. Propriedades de mistura das farinhas**

As características farinográficas da farinha de trigo e das farinhas compostas foram determinadas em farinógrafo Brabender®, pelo método 54-21 da AACC (AACC, 1995).

#### **b. Perfil de textura**

A textura dos pães foi avaliada de acordo com o método modificado da AACC 74-09 (AACC, 1995), utilizando um texturômetro TA-XT2i (Stable Micro System, Inglaterra). Após estocagem por 24 horas, os pães foram fatiados (10 mm de espessura), as fatias externas de ambas as laterais foram descartadas e o miolo de cada fatia foi cortado com molde de 40 mm de diâmetro, descartando as cascas. As amostras foram comprimidas por duas vezes até 40% da altura com um probe cilíndrico de 35 mm de diâmetro, velocidade de pré-teste, teste e pós-teste de 5,0, 2,0 e 5,0 mm/s, respectivamente. Para cada pão, quatro repetições foram realizadas. Esta análise foi repetida durante os períodos de armazenamento de 96 e 120 horas, nas mesmas condições. Foram considerados parâmetros de dureza e elasticidade.

#### **c. Volume específico dos pães**

Após 1 hora de resfriamento dos pães em temperatura ambiente, o volume foi determinado pela técnica de deslocamento de sementes. O volume

específico foi calculado pela razão entre o volume e seu peso (mL/g). Este procedimento foi realizado também nos períodos de estocagem de 24, 96 e 120 horas. Duas repetições foram realizadas por tratamento.

#### ***d. Cor do miolo dos pães***

A cor do miolo dos pães, determinada após 24 horas de armazenamento, foi obtida com o auxílio de colorímetro Minolta (Chroma meter CR-300, sistema L\*, a\*, b\* Color Space, por refletância). Os parâmetros de cor avaliados foram luminosidade (L\*, 100 para branco e 0 para preto); e coordenadas de cromaticidade do sistema CIE/LAB (a\*, (-) para verde e (+) para vermelho; b\*, (-) para azul e (+) para amarelo; com iluminante D65 e 45° de ângulo).

#### ***e. Avaliação sensorial***

Formulações selecionadas a partir de ensaios instrumentais foram avaliadas sensorialmente. A equipe, formada por provadores não treinados, foi constituída por 26 estudantes de pós-graduação em Ciência de Alimentos (UEL, PR), sendo que destes, 7 eram do sexo masculino. Dez provadores estavam dentro da faixa etária de 18–25 anos e os demais entre 26-35 anos. A degustação foi realizada em sessão única, com pães preparados com 24 horas de antecedência e fatiados no momento da análise. As fatias foram obtidas das partes centrais dos pães e as extremidades foram descartadas e todas padronizadas com altura de 10mm. Foi empregado um teste de preferência por ordenação. De acordo com os dados obtidos, fez-se a avaliação estatística através da tabela para o teste de ordenação de Newell e Mac Farlane (1987), que define o valor das diferenças críticas ao nível de 5%.

#### *Análise dos resultados*

Para todos os experimentos, os resultados obtidos representam médias de replicatas, os quais foram analisados quanto à variância (ANOVA).

Diferenças significativas entre as médias dos tratamentos foram observadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa Statistica 7.0 (Statsoft, USA).

### 3 Resultados e Discussão

#### *Teor de celulose e hemicelulose no bagaço de malte*

Observou-se que, no bagaço de malte, as hemiceluloses correspondiam a  $28,97 \pm 2,32$ g/100g fibra alimentar total (FAT) e, a celulose, a  $11,35 \pm 0,69$ g/100g FAT. Os resultados encontrados estão de acordo com Mussatto, Dragone & Roberto (2006) que obtiveram aproximadamente 17% de celulose e 28% de hemicelulose. Em cereais, as classes de hemiceluloses mais comuns são as  $\beta$ -glucanas, presentes no endosperma, e as arabinoxilanas, constituintes da parede celular que neste caso, são predominantes no bagaço de malte (Courtin e Delcour, 2002).

#### *Efeito da extrusão reativa*

O efeito do tratamento do bagaço com as duas enzimas, associado à extrusão, foi avaliado em relação ao teor de açúcares redutores, índice de solubilidade total e capacidade de retenção de água. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** – Quantificação de açúcares redutores (AR), índice de solubilidade total (IST) e capacidade de retenção de água (CRA) no bagaço de malte submetido a diferentes tratamentos.

Teor de enzima	AR (mg/100g)		IST (g/100g amostra)		CRA (g/100g amostra)	
	EP	EC	EP	EC	EP	EC
BNT	11,08 d A	11,08 e A	6,38 c A	6,38 c A	5,97 a A	5,97 a A
0,0%	12,34 d A	12,34 e A	6,59 c A	6,59 c A	5,99 a A	5,99 a A
0,5%	14,24 d B	21,25 d A	11,44 b B	13,01 b A	5,85 b,c A	5,86 a A
BT	20,10 c B	27,85 c A	12,12 b B	13,50 b A	5,81 b,c B	5,93 a A
1,5%	20,42 c B	30,73 c A	12,73 b B	13,00 b A	5,90 b,c A	5,86 a B
3,0%	25,75 b B	35,41 b A	13,20 b B	12,20 b A	5,89 b,c A	5,80 a,b B
5,0%	51,45 a B	62,11 a A	16,76 a B	17,34 a A	5,68 c A	5,60 b B

Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as enzimas EP e EC, para AR, IST ou CRA

BNT – Bagaço de malte não tratado. Controle geral, sem tratamento enzimático ou de extrusão

BT- Bagaço de malte tratado.

EP - Enzima Pentopan Mono BG® (xilanases)

EC - Enzima Celluclast BG® (mistura de enzimas contendo celulase, xilanase e  $\alpha$ -amilase)

O teor de açúcares redutores (AR), expressos como xilose (Xil), presentes no extrato aquoso dos BNT e BT com as diferentes enzimas. A enzima EC mostrou-se mais eficiente quanto à formação de AR, diferindo significativamente quando comparada com as respectivas concentrações de EP. Quando a concentração de 5,0 % pra cada uma das enzimas foi utilizada, os extratos aquosos obtidos apresentaram o maior teor de xilose. Para cada uma das enzimas (EP ou EC), não houve diferença significativa entre as concentrações de 1,0 e 1,5%.

A quantificação de AR, relacionada com a produção de Xil, permitiu observar que após tratamento enzimático em extrusor, podem estar presentes dois tipos de arabinoxilanas no bagaço de malte, aquelas insolúveis em água (AR-IA) e também aquelas solubilizadas enzimaticamente (AR-SE).

A atividade enzimática observada nas soluções preparadas para EP foi de  $1563 \pm 102$  kat/mL, para xilose como produto. A EC apresentou  $2215 \pm 94$  kat/mL e  $830 \pm 62$  kat/mL, para xilose e glicose como produtos, respectivamente. A EC apresentou maior atividade, em torno de 40% maior, com relação à hidrólise de polissacarídeos formados por xilose, em todas as concentrações aplicadas, quando comparado a EP. Sabendo que esta enzima comercial apresenta atividade sobre a celulose, e que a hidrólise desta facilita o acesso às

hemiceluloses, a maior atividade sobre as xilanas pode ser devida ao efeito somático das classes envolvidas (celulase e hemicelulase).

Fibras alimentares de caráter insolúvel apresentam alta capacidade de absorver água. A eficiência do tratamento enzimático foi também demonstrada pelos resultados obtidos na determinação do índice de solubilidade total (IST) e da capacidade de retenção de água (CRA). O IST do bagaço tratado com 0,5% a 3,0% de enzima foi aproximadamente duas vezes superior ao do BNT e ao do extrusado com 0,0% de enzima. Apenas o tratamento com 5,0% de EP ou de EC diferiu daqueles com concentrações mais baixas, apresentando o maior IST. Quanto à CRA, ocorreu ligeira diminuição nas amostras tratadas com enzima apenas no caso de EP. Parte do aumento na solubilidade pode ser explicada pela análise das fibras alimentares (Tabela 3).

**Tabela 3** – Quantificação de fibras alimentares solúvel (FAS), insolúvel (FAI) e total (FAT).

Teor de enzima	FAS (g/100g amostra)		FAI (g/100g amostra)		FAT (g/100g amostra)	
	EP	EC	EP	EC	EP	EC
BNT	3,21 b A	3,21 e A	64,92 a A	64,92 a A	68,13 a A	68,13 a A
0,0%	3,24 b A	3,24 e A	64,22 a A	64,22 a A	67,46 a A	67,46 a A
0,5%	3,24 b B	3,46 d,e A	63,55 a A	58,88 b,c B	66,79 a,b A	62,35 b,c B
1,0%	3,22 b B	3,61 c,d A	62,25 a,b A	59,56 b B	65,47 a,b,c A	63,17 b,c B
1,5%	3,91 a B	3,89 b,c A	61,27 a,b,c A	59,55 b B	65,18 a,b,c A	63,44 b B
3,0%	3,84 a B	4,17 a,b A	57,76 b,c A	57,49 b,c B	61,61 b,c B	61,67 b,c A
5,0%	3,96 a B	4,21 a A	56,33 c A	55,64 c B	60,29 c A	59,85 c B

Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as enzimas EP e EC, para FAS, FAI ou FAT.

BNT – Bagaço de malte não tratado. Controle geral, sem tratamento enzimático ou de extrusão

BT- Bagaço de malte tratado

EP - Enzima Pentopan Mono BG® (xilanases)

EC - Enzima Celluclast BG® (mistura de enzimas contendo celulase, xilanase e  $\alpha$ -amilase)

Houve aumento de fibras alimentares solúveis (FAS) e diminuição de FAI, com o aumento da concentração das enzimas. Não houve diferença entre o controle geral (BNT) e o bagaço de malte tratado apenas com extrusão (concentração 0,0% de enzima), demonstrando que esse efeito é resultante da hidrólise enzimática associada à extrusão. Pode-se observar aumento na

concentração de fibras solúveis pelo tratamento com EP em concentrações acima de 1,5%, porém houve uma tendência de aumento das FAS para todas as concentrações de enzima EC acima de 0,5%, devido à maior capacidade de hidrólise desta.

O aumento da concentração de fibras solúveis e IST, associado à diminuição da CRA, é consequência do tratamento enzimático, que hidrolisa as arabinoxilanas, liberando-as da parede celular, tornando-as solúveis em água. Ocorre também redução do peso molecular das arabinoxilanas devido à hidrólise da cadeia de xilana, liberando resíduos de açúcares (Courtin & Delcour, 2002), explicando também o aumento da presença de AR em extratos obtidos das amostras tratadas com enzimas (Tabela 2).

Os tratamentos realizados com as enzimas EP e EC nas concentrações de 1,0% e 5,0% foram selecionados para aplicação em panificação, de acordo com os resultados obtidos pela avaliação do efeito da extrusão reativa.

#### *Aplicação em panificação*

Na Tabela 4 estão apresentados os parâmetros farinográficos da farinha de trigo empregada na produção dos pães, assim como também os das farinhas compostas obtidas pela substituição de 12% da farinha de trigo por bagaço de malte tratado e não tratado.

**Tabela 4** – Parâmetros farinográficos da farinha de trigo e das farinhas compostas empregadas nos testes de panificação.

Amostra	Farinografia			
	Absorção de água (%)	Tolerância a mistura (UF)	Tempo de desenvolvimento de massa (min)	Estabilidade (min)
FT	63,7	15	8,0	15,2
FT+BNT	72,3	20	9,5	5,8
FT+BT(EP1,0%)	71,9	25	10,0	6,7
FT+BT(EP5,0%)	72,1	20	9,3	6,5
FT+BT(EC1,0%)	69,5	25	9,2	7,1
FT+BT(EC5,0%)	68,9	25	9,5	6,3

FT – Farinha de trigo

BNT – Bagaço de malte não tratado. Controle geral, sem tratamento enzimático ou de extrusão

BT- Bagaço de malte tratado

EP - Enzima Pentopan Mono BG® (xilanases)

EC - Enzima Celluclast BG® (mistura de enzimas contendo celulase, xilanase e  $\alpha$ -amilase)

Em média, as formulações desenvolvidas com bagaço de malte tratado com EP e EC absorveram, respectivamente, cerca de 13% e 10% de água a mais, quando comparadas à farinha de trigo. Também a farinha que continha BNT teve uma absorção de água superior à da FT. Em panificação, arabinoxilanas podem aumentar significativamente a absorção de água, pela formação de pontes de hidrogênio entre as estruturas não-substituídas de xilose, além de reduzir a elasticidade da massa, tornando-a mais extensível (Courtin & Delcour, 2002).

Arabinoxilanas de caráter insolúvel e outras fibras interferem na formação do glúten, competindo por água e alterando as condições para o desenvolvimento da rede protéica. A incorporação de alto conteúdo de fibras, pela adição do bagaço de malte, afetou as propriedades reológicas da massa (Tabela 4). As massas das farinhas compostas apresentaram maior tolerância à mistura, maior tempo de desenvolvimento e menor estabilidade, quando comparadas à de farinha de trigo. A importância da mistura da massa está em homogeneizar os ingredientes, expondo as superfícies das partículas da farinha permitindo uma interação com a água e hidratação. Durante o tempo de mistura, partículas vão perdendo sua identidade e a massa ganha uma aparência homogênea. O desenvolvimento da massa, resultante do aumento de sua consistência é acompanhado pela observação da força requerida durante a mistura. O tratamento do bagaço com enzimas não parece ter afetado significativamente os parâmetros reológicos, quando comparados aos do bagaço sem tratamento. Embora quando comparados com a farinha de trigo (FT) tenham apresentado estabilidade bem inferior a desta (15,2 min).

Pães desenvolvidos com farinhas compostas de BT com diferentes tipos e concentrações de enzimas foram comparados aos desenvolvidos com farinha composta de BNT, recebendo a equivalente concentração de enzima diretamente na massa (Tabelas 5 e 6).

**Tabela 5** – Dureza e elasticidade dos pães desenvolvidos com farinhas compostas com 12 % de bagaço de malte, tratado (BT) ou não tratado (BNT) e diferentes formas de aplicação das enzimas.

Amostra	Dureza (N)			Elasticidade		
	24 h	72 h	120 h	24 h	72 h	120 h
FT+BNT	10,15 a B	10,87 c,d B	23,27 a A	0,91 a,b A	0,90 a,b A	0,84 a, B
FT+BT(EP1,0%)	10,04 a B	13,01 b,c B	25,38 a A	0,91 a,b A	0,84 c,d B	0,86 a A,B
FT+BT(EP5,0%)	11,92 a C	14,62 a,b B	22,86 a A	0,87 b A	0,82 c B	0,85 a B
FT+BT(EC1,0%)	10,42 a C	16,97 a B	25,19a A	0,96 a A	0,86 c,d B	0,86 a B
FT+BT(EC5,0%)	9,82 a B	16,75 a A,B	22,6 a A	0,92 a,b A	0,86 c,d B	0,85 a B
FT+BNT+EP1,0%	6,29 b C	9,84 c,d B	18,8 a A	0,91 a,b A	0,87 b,d A	0,88 a A
FT+BNT+EP5,0%	5,44 b B	10,59 c,d A,B	16,3 a A	0,94 a A	0,88 a,b,d A	0,85 a A
FT+BNT+EC1,0%	5,51 b C	8,76 d B	18,06 a A	0,94 a A	0,90 a A,B	0,86 a B
FT+BNT+EC5,0%	5,77 b C	10,25c,d B	18,33 a A	0,94 a A	0,90 a,b A,B	0,88 a B

Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para Dureza e Elasticidade

FT – Farinha de trigo

BNT – Bagaço de malte não tratado.

BT- Bagaço de malte tratado

EP - Enzima Pentopan Mono BG® (xilanases)

EC - Enzima Celluclast BG® (mistura de enzimas contendo celulase, xilanase e  $\alpha$ -amilase)

n = 4

Durante as primeiras 24 horas de armazenamento, verificou-se que as amostras dividiram-se em dois grupos que diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) quanto à dureza. Pães formulados com farinha de BT por extrusão reativa, FT+BT(EP1,0%); FT+BT(EP5,0%); FT+BT(EC1,0%); FT+BT(EC5,0%), não apresentaram diferença daquele formulado com farinha de BNT (FT+BNT). No entanto, todos os pães que receberam diferentes tipos e concentrações de enzimas, adicionados diretamente à massa (FT+BNT+EP1,0%; FT+BNT+EP5,0%; FT+BNT+EC1,0%; FT+BNT+EC5,0%), diferiram dos demais, apresentando menor dureza (aproximadamente 50% menor) nas primeiras 24 horas.. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as diferentes concentrações aplicadas pelas duas formas de ambas as enzimas (Tabela 5).

Rouau (1993) demonstrou que, após a mistura dos ingredientes, há solubilização de polissacarídeos não-amiláceos (PNA) provocado por fenômenos físicos, como a ruptura da ligação entre arabinoxilanas na parede celular. Cleemput, Booij, Hessing, Gruppen & Delcour (1997) verificaram que após adição de enzimas à massa, durante o tempo de mistura, há maior solubilização

de cadeias de arabinoxilanas insolúveis, explicando porque os pães que receberam enzima na massa apresentaram menor dureza. A solubilização de arabinoxilanas ocorre também durante o período de fermentação e, de forma mais expressiva ainda, durante o processo de assamento dos pães. Arabinoxilanas de caráter solúvel proporcionam a formação de massa mais flexível e menos dura (Wang, van Vliet & Hamer, 2004).

A bioconversão ocorrida durante o tratamento do bagaço com enzimas durante a extrusão não foi suficiente para provocar modificações na dureza dos pães.

A dureza de todos os pães aumentou com o tempo de armazenamento e não houve diferença entre as formulações após 120 horas de armazenamento.

Farinhas com elevado teor de fibra alimentar de caráter insolúvel absorvem maiores quantidades de água, se comparadas à farinha de trigo, como foi observado na Tabela 4. Conseqüentemente, há adição de maior quantidade de água durante a manufatura de pães. O aumento na dureza durante o armazenamento dos pães pode estar relacionado com a perda de água livre e a retrogradação, conseqüência de mobilidade elevada das moléculas de amido (Hung, Maeda & Morita, 2007). Porém, em panificação, este efeito é mais ameno, já que a elevada quantidade de água pode provocar um efeito de plastificação da matriz amido-glúten, reduzindo sua rigidez (Levine & Slate, 1990).

A elasticidade do miolo representa o grau de recuperação deste após uma compressão. Um pão de boa qualidade apresenta alta elasticidade, ou seja, recupera-se quase totalmente após aplicação de determinada força. A adição de elevado conteúdo de fibras em pães pode interferir na interação entre glúten e amido gelatinizado, resultando em miolo com maior dureza e menos elástico (Sangnark e Noomhorm, 2004). A elasticidade dos pães variou de 0,87 a 0,96 (Tabela 5) e, de modo geral, diminuiu ao longo do armazenamento. Após 72 horas de armazenamento, FT+BT(EP1,0%) e FT+BT(EP5,0%) apresentaram os menores índices de elasticidade (0,84 e 0,82, respectivamente), e todas as formulações não apresentaram diferença de elasticidade após 120 horas.

A coloração dos pães foi pouco afetada pelas diferentes formulações estudadas (Tabela 6), com exceção do parâmetro  $b^*$ . Quando comparados ao controle (FT+BNT), todos os pães formulados com farinha de

bagaço de malte tenderam a uma maior intensidade amarela, enquanto que os pães formulados com bagaço não tratado e que receberam enzima na massa apresentaram índices similares de b\*. Uma explicação é que o processo de extrusão alterou a configuração das proteínas, permitindo maior interação com açúcares, resultando em reações de escurecimento com maior intensidade (caramelização e reação de Maillard) (Mohamed, Rayas-Duarte & Xu, 2008).

**Tabela 6 –** Cor e volume específico dos pães desenvolvidos com farinhas compostas (12 % de bagaço de malte, tratado (BT) ou não tratado (BNT) e diferentes formas de aplicação das enzimas

Amostra	Luminosidade L*	Coordenadas de cromaticidade		Volume específico (mL/g)			
		a*	b*	0 h	24 h	72 h	120 h
FT+BNT	59,39 a	5,43 a	19,95cd	3,26 a,b	3,13 a,b	3,20 a	2,68 c
FT+BT-EP1,0%	57,94 a	5,68 a	20,67 a,b,c	3,42 a,b	3,31 a,b	3,51 a	2,67 c
FT+BT-EP5,0%	57,37 a	5,90 a	20,89 a,b,c	3,48 b	3,29 a,b	3,45 a	2,66 c
FT+BT-EC1,0%	57,15 a	5,90 a	20,93 a,b	3,26 b	3,13 b	3,24 a	2,80 c
FT+BT-EC5,0%	59,26 a	5,62 a	21,19 a	3,13 a,b	3,10 a,b	3,25 a	2,90 b,c
FT+BNT-EP1,0%	58,33 a	5,49 a	19,93 c,d	3,32 a,b	3,45 a,b	3,50 a	3,28 b,c
FT+BNT-EP5,0%	58,07 a	5,52 a	19,97 b,c,d	3,41 a,b	3,45 a,b	3,46 a	3,37 a,b,c
FT+BNT-EC1,0%	58,02 a	5,39 a	19,48 d	3,69 a	3,74 a	3,69 a	3,43 a
FT+BNT-EC5,0%	58,60 a	5,37 a	19,71 d	3,72 a	3,76 a,b	3,76 a	3,46 a,b

FT – Farinha de trigo

BNT – Bagaço de malte não tratado.

BT- Bagaço de malte tratado

EP - Enzima Pentopan Mono BG® (xilanases)

EC - Enzima Celluclast BG® (mistura de enzimas contendo celulase, xilanase e  $\alpha$ -amilase)

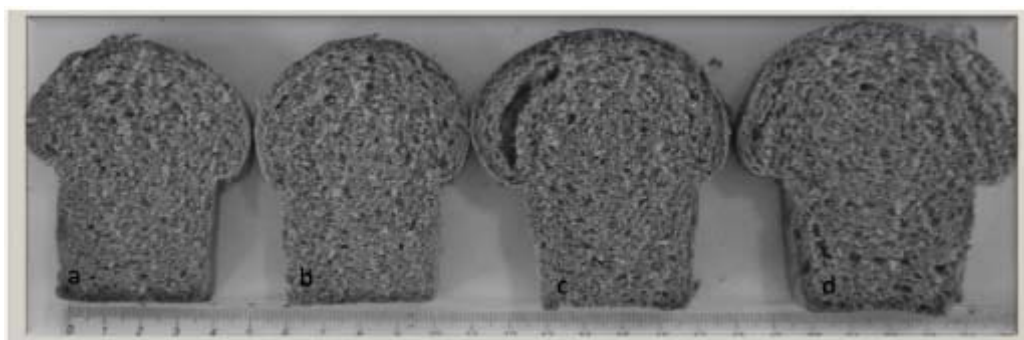
Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente (P < 0,05)

n = 6 para cor, n=2 para volume específico

O volume específico de nove formulações de pão foi determinado (Tabela 6) e, até as 72 horas de estocagem, os pães não foram afetados pelas diferenças entre as formulações. Os resultados de volume específico foram similares aos obtidos por Stojceska & Ainsworth (2008) em pães com 10% de substituição da farinha de trigo por bagaço de malte e aplicando diretamente à massa a enzima EP.

No quinto dia de observação (120 horas), o volume específico dos pães com farinha de bagaço de malte tratada e sem tratamento, diminuiu em torno de 20%, em relação ao volume inicial (0 horas).

A partir dos dados experimentais, quatro formulações foram selecionadas e avaliadas sensorialmente: (1) formulação controle, desenvolvida com bagaço de malte não tratado (FT+BNT); (2) formulação desenvolvida com bagaço de malte tratado (FT+BT(EP1,0%)); (3) formulação desenvolvida com bagaço não tratado e com mesma concentração e tipo de enzima adicionada na massa (FT+BNT+EP 1%) e a (4) formulação que apresentou tendência de maior volume específico (FT+BNT+EC 5%) (Figura 1). As formulações selecionadas foram analisadas sensorialmente, por teste de ordenação, quanto à preferência global.



**Figura 1 –** Aparência dos pães elaborados com as formulações avaliadas sensorialmente. (a) FT+BNT; (b) FT+BT(EP1,0%); (c) FT+BNT+EP1,0%; (d) FT+BNT+EC5,0%

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 7), os provadores demonstraram igual preferência pelas formulações desenvolvidas. Isso indica que, apesar dos tratamentos terem sido eficientes na modificação da farinha de bagaço e nas características dos pães, sensorialmente os pães produzidos com as farinhas tratadas e não tratadas não se diferenciaram em relação à preferência.

**Tabela 7 –** Somatória dos valores obtidos por teste de ordenação – preferência das diferentes formulações de pães desenvolvidas com farinhas compostas (12 % de bagaço de malte, tratado (BT) ou não tratado (BNT), e diferentes formas de aplicação das enzimas

<b>Formulações</b>	<b>Somatória</b>
FT+BNT	54 <sup>ns</sup>
FT+BT(EP1,0%)	68 <sup>ns</sup>
FT+BNT+EP1,0%	68 <sup>ns</sup>
FT+BNT+EC5,0%	60 <sup>ns</sup>

FT – Farinha de trigo

BNT – Bagaço de malte não tratado.

BT- Bagaço de malte tratado

EP - Enzima Pentopan Mono BG® (xilanases)

EC - Enzima Celluclast BG® (mistura de enzimas contendo celulase, xilanase e  $\alpha$ -amilase)

<sup>ns</sup> Não diferem significativamente ( $P < 0,05$ )

#### 4 Conclusão

O processo de hidrólise enzimática do bagaço de malte em extrusor foi aplicado em substituição aos processos tradicionais, não requisitando pré-tratamentos de solubilização das fibras com álcalis, e não demandando tempo prolongado de reação. Avaliações quanto à utilização de tratamento prévio em resíduo industrial, bagaço de malte, para hidrolisar cadeias de arabinoxilana a partir de duas enzimas comerciais foram realizadas. Houve modificação da estrutura das fibras do bagaço de malte tratado enzimaticamente em extrusor e os resultados obtidos indicaram que houve quebra da cadeia de hemiceluloses, liberando resíduos de xilose.

A adição de farinha de bagaço de malte em pães resultou em maior absorção de água. O tratamento enzimático em extrusor do bagaço de malte (BT) não afetou as características de panificação quando comparado com a farinha de bagaço de malte não tratada (BNT). Porém, pães que foram desenvolvidos com esta farinha (BNT) e adicionados de enzimas (EP e EC) diretamente à massa, apresentaram melhor dureza, elasticidade e volume específico, quando comparados com pães desenvolvidos sem adição de enzima ou com BNT. A adição de enzima diretamente à massa provoca alterações da

massa observadas instrumentalmente, porém não foi observada preferência pelos provadores quanto as diferentes formulações avaliadas.

## **CAPÍTULO IV**

## OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PANIFICAÇÃO APLICADO EM FARINHAS MISTAS CONTENDO BAGAÇO DE MALTE MODIFICADO POR XILANASES DURANTE A EXTRUSÃO

### Resumo

O resíduo gerado na produção de cerveja, obtido após liquefação e sacarificação do amido é chamado de bagaço de malte e é composto essencialmente por material hemicelulósico. Neste estudo, esse bagaço foi modificado por processo bioreativo, com aplicação de duas enzimas, Pentopan Mono BG® (EP) e Celluclast BG® (EC), em diferentes concentrações (1,0 e 5,0%), empregando extrusor monorosca como reator, com o intuito de hidrolisar arabinoxilanas de caráter insolúvel. A ação do processo foi avaliada pela composição de monossacarídeos presentes e por Cromatografia de exclusão estérica de alta pressão acoplada a detector de índice de refração diferencial e espalhamento de luz em multiângulos (HPSEC-MALLS). Posteriormente, um dos tratamentos foi selecionado com critérios de produção de maior quantidade de resíduos de xilose, e o produto obtido foi aplicado em panificação. Foi aplicada a metodologia de superfície de resposta para avaliar os efeitos do tipo de mistura, da quantidade de água adicionada à massa e do tempo de fermentação nas características dos pães. Dentre os tratamentos estudados, o processo bioreativo de maior quantificação de xilose foi EP1,0%, no entanto, compostos de menor peso molecular foram encontrados nos tratamentos EC5,0% e EC1,0%. Em panificação, a melhor condição encontrada foi na elaboração de pães que sofreram a adição da farinha de bagaço de malte à massa de forma lenta, com quantidade de água adicionada de 72 mL e 90 minutos de tempo de fermentação para a formulação FT+BT(EP1,0%). O processo bioreativo foi efetivo na modificação das arabinoxilanas e pode-se observar melhorias nos pães desenvolvidos com bagaço de malte tratado enzimaticamente em extrusor.

**Palavras-chave:** Resíduo industrial cervejeiro. CG-MS. HPSEC-MALLS. Arabinoxilanas. Panificação.

### 1 Introdução

Bagaço de malte representa um resíduo abundante e disponível na grande maioria das indústrias cervejeiras. O destino desse produto tem sido, principalmente, para alimentação animal. No entanto, outras possibilidades de uso são descritas na literatura, como em produtos ricos em fibras e em aplicações bioquímicas e químicas (Watanabe, Inaida e Karakawa, 1980; Shindo e Tachibana, 2004; Stojceska, Ainsworth, Plunkett e Ibanoglu; 2008).

O bagaço de malte, obtido após liquefação e sacarificação do amido proveniente do malte, é composto essencialmente por material hemicelulósico. A composição depende da variedade da cevada utilizada e das condições de moagem e de fabricação da cerveja. As fibras presentes no bagaço são as que compõem as cascas do grão de cevada e, também, algum material fibroso presente nos adjuntos, como por exemplo resíduos de “grits” de arroz ou milho. Podem ser representadas, geralmente, por celulose, lignina e hemiceluloses. As arabinoxilanas, que compõem o grupo das hemiceluloses, estão presentes na concentração de 21% a 28% no bagaço de malte (Kanauchi et al., 2001; Mussatto e Roberto, 2005). Arabinoxilanas são estruturas formadas por cadeias lineares de resíduos de xilose [(1-4)- $\beta$ -D-xilanopiranosil]] e podem se apresentar de quatro formas distintas, dependendo do padrão de substituição e grau de polimerização (Vinkx e Delcour, 1996). A primeira forma é a cadeia de xilose sem nenhuma substituição (Xil-ns). Nas demais formas de cadeias de arabinoxilanas, os substituintes mais comuns são resíduos de arabinose ( $\alpha$ -L-arabinofuranose), que interagem com a cadeia de xilose nas posições O-2 e/ou O-3 (Xil-2-O-s ou Xil-3-O-s/Xil-2-3-O-s). Resíduos de ácido ferúlico ou *p*-coumárico podem estar presentes na cadeia, interagindo na posição O-5 da arabinose (Ishii, 1997).

Segundo Courtin e Delcour (2002), a solubilidade está ligada ao número de monômeros de xilose presentes: quanto maior o grau de substituição, maior é a solubilidade da cadeia de arabinoxilana. Quando não há substituição das xiloses por arabinoses, pode ocorrer agregação das cadeias de arabinoxilana, através de pontes de hidrogênio nas estruturas não-substituídas.

Arabinoxilanas são estruturas capazes de afetar significativamente as características viscoelásticas das massas para panificação, assim como seus produtos finais, causando formação de suspensões viscosas com arabinoxilana solúvel na presença de água, através de ligação cruzada entre arabinoxilana e um ácido ferúlico adjacente (Figueroa-Espinoza e Rouau, 1998), contribuindo positivamente para a estrutura externa (casca) do pão e também para o volume do produto; estabilização de filmes protéicos através da diminuição da formação de bolhas pelo aumento da viscosidade da suspensão (Courtin e Delcour, 2002); interação com o glúten (Michniewicz, Biliaderi e Bushuk, 1991) e aumento indesejável da capacidade de retenção de água pela fração insolúvel

afetando a distribuição de umidade por toda a superfície da massa e, conseqüentemente, modificando as propriedades reológicas da rede de glúten, exigindo tempo maior de mistura (Courtin e Delcour, 2002).

Formas de compensar o baixo desempenho de pães com fibras são a adição de glúten vital na massa e também adição de quantidades de água suficiente para hidratar os componentes da fibra (Gormley e Morrissey, 1993).

Grande parte das arabinoxilanas presentes no bagaço de malte é de caráter insolúvel. Para que a aplicação deste produto em alimentos tenha maior aceitabilidade, processos de modificação da estrutura das fibras são aplicados. Esses processos normalmente ocorrem a partir de tratamentos químicos, gerando grande volume de resíduos (Sangnark e Noomhorm, 2004).

O processo de extrusão associado ao tratamento enzimático utilizado neste estudo foi realizado com o objetivo de permitir a hidrólise dos compostos em processo mais rápido e sem geração de efluentes. Para isso, utilizou-se hemicelulases, que tem capacidade de afetar significativamente a estrutura da arabinoxilana. A endo  $\beta$ -1,4 xilanase (EC 3.2.1.8) é o principal grupo de enzimas envolvidas na degradação da xilana. Trata-se de uma endo-enzima que degrada, aleatoriamente, a cadeia principal de xilana, liberando xilo-oligossacarídeos e que tem diversas aplicações industriais, como por exemplo, em panificação (Sungurtas, Swanston, Davies e McDougall, 2004).

A efetividade do processo de hidrólise em biorreator foi avaliada neste estudo e um dos produtos resultantes aplicado em panificação. O efeito da quantidade de água adicionada e condições de processo foi estudado.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Material

A farinha de trigo (FT), com características: proteína, 15,6g/100g (b.s.); características alveográficas W,  $322 \times 10^{-4}$  J; P/L, 2,10; P, 133 mm; L, 62 mm, foi fornecida pelos moinhos LCA Ltda. (Sertanópolis, PR). Açúcar, sal, gordura vegetal hidrogenada, fermento biológico instantâneo e emulsificante (SSL) foram adquiridos no comércio local.

As duas enzimas comerciais utilizadas: Pentopan® Mono BG (codificada como EP) e Celluclast® BG (EC) foram cedidas pela Novozymes Latin America Ltda. Pentopan® Mono BG é uma endo- $\beta$ -1,4-xilanase (pentosanase) com atividade de 2500 UXF-T/g (unidades de xilanase fúngica - em trigo/g), e Celluclast® BG é uma mistura de enzimas, contendo principalmente celulase, além de xilanase e  $\alpha$ -amilase, e apresenta atividade enzimática expressa como celulase de 3500 UEG/g (unidades de endoglucanase/g).

Bagaço de malte (22,40% proteínas; 4,96% lipídeos; 4,06% cinzas; 67,9% fibras totais, sendo 3,53% fibras solúveis e 64,37% fibras insolúveis; 28,97% hemicelulose e 11,35% celulose, em base seca) foi fornecido pela Cervejaria Spoller (Londrina – PR, Brasil).

O bagaço de malte foi seco em estufa com circulação de ar (60°C/12 horas), quebrado em triturador de alimentos marca M Vithory (HP1/2; rotação 3740 rpm), para redução da granulometria, e moído em moinho de facas da marca Tecnal (modelo TE 631/2, Tecnal, São Paulo, Brasil) com refrigeração, e acoplado a um termostato e medidor de rotação.

A farinha obtida com 8% de umidade e tamanho de partícula menor que 150  $\mu$ m (50%) e maior que 150  $\mu$ m (50%), foi codificada e armazenada em potes hermeticamente fechados, sob refrigeração (-4°C).

## 2.2 Métodos

### *Modificação enzimática do bagaço de malte em extrusor*

As concentrações enzimáticas, tanto para Pentopan Mono BG, quanto para Celluclast BG, foram determinadas em relação à quantidade de hemicelulose contida na farinha de bagaço de malte (29g/100g). As enzimas foram solubilizadas em solução tampão acetato de sódio 0,05N, pH 5,0, de modo que a adição da solução correspondesse a concentrações de 1,0 e 5,0% para ambas as enzimas.

Foi adicionado a 500 g de bagaço (50% umidade), 30 mL de solução tampão contendo enzima específica em concentração pré-definida, e o teor de umidade foi padronizado para 65%. A mistura foi homogeneizada e

mantida a 50°C por uma hora antes da extrusão, em recipiente fechado, em estufa com circulação de ar.

O extrusor utilizado neste estudo foi da marca Cerealtec, modelo CT L15 (São Paulo-SP), monorosca, com canhão de 420 mm de comprimento e 19.4 mm de diâmetro, parafuso com taxa de compressão de 2:1, e matriz de 6 mm de diâmetro. Fatores como velocidade de parafuso (100 rpm) e vazão de alimentação (90 g min<sup>-1</sup>) foram constantes. As temperaturas das zonas de alimentação e de reação foram mantidas a 50°C, enquanto que da zona de saída foi mantida a 100°C, com o intuito de inativar as enzimas. As condições foram definidas por testes preliminares e todos os tratamentos foram realizados sob as mesmas condições, em duplicata e aleatoriamente.

Após a hidrólise, os extrusados foram secos em estufa com circulação de ar (60°C/12 horas), quebrados em triturador de alimentos marca M Vithory (HP1/2; rotação 3740 rpm), para redução da granulometria, e moídos em moinho de facas da marca Tecnal (modelo TE 631/2, Technal, São Paulo, Brasil) com refrigeração, e acoplado a um termostato e medidor de rotação.

Obteve-se farinhas com 8% de umidade e tamanho de partícula menor que 150 µm (50%) e maior que 150 µm (50%), as quais foram codificadas e armazenadas sob refrigeração (-4°C).

#### *Extração de arabinosilanas solúveis em água (AX-SA)*

Para avaliação dos efeitos da extrusão reativa, foram caracterizadas e quantificadas as arabinosilanas solúveis em água (AX-SA) dos bagaços tratados (BT) com as diferentes enzimas e comparadas às do bagaço não tratado (BNT) e às do bagaço tratado por extrusão, sem adição de enzimas.

Os extratos de AX-SA foram obtidos a partir de 1,0g de cada amostra, em água deionizada (1:10 p/v). Após agitação (2 h, 30°C), as suspensões foram centrifugadas (3000g, 15 min, 4°C), filtradas (filtro Whatmann n° 1) e liofilizadas (Liofilizador Labconco, modelo LYPH-LOCK 1L). Este extrato foi codificado como F 0%.

### *Fracionamento de AX-SA*

Extratos obtidos como descrito anteriormente, foram fracionados, por precipitação alcoólica, com etanol em concentração de 65% (v/v), por 12 horas, seguida de centrifugação (3000 x g, 15 min, 4°C) e liofilização do precipitado (Liofilizador Labconco, modelo LYPH-LOCK, 1L) e codificados como F 65%.

### *Composição de monossacarídeos*

A composição de monossacarídeos foi determinada pela hidrólise de 5 mg de AX-SA com 1,0 mL de ácido trifluoracético 2M em tubo de hidrólise a 100°C por 5 horas. O material hidrolisado foi reduzido acrescentando NaBH<sub>4</sub> por 12 horas em temperatura ambiente. Após esse período, resina catiônica foi utilizada para neutralizar o material até pH 5-7, e o material foi concentrado em evaporador rotativo, seguido de lavagens consecutivas com álcool metílico para retirada do boro presente na amostra. A acetilação foi realizada com solução contendo 1 mL de anidrido acético e 1 mL de piridina durante 1 hora a 100°C. A reação foi paralisada adicionando água e clorofórmio e a piridina foi removida a partir de lavagens consecutivas com sulfato de cobre. Os acetatos de alditol resultantes foram analisados em GC-MS usando cromatógrafo gasoso marca Varian, modelo 3300 acoplado a espectrômetro de massa Finnigan Ion-Trap (modelo 810 R-12) com coluna capilar DB-225 (30 m x 0,25 mm diâmetro interno) programado para 50°C (durante injeção) até 220°C (temperatura constante) em 40°C min<sup>-1</sup>. Hélio foi utilizado como gás de arraste. Monossacarídeos foram identificados de acordo com os tempos de retenção e o perfil de impacto de elétrons (Kai & Petkowicz, 2010).

### *Homogeneidade da fração de arabinoxilana*

A verificação da homogeneidade da amostra foi realizada com 1mg de AX-SA, solubilizadas em solução de nitrito de sódio 0,2mol/L contendo 200 ppm de azida sódica, filtradas em membrana Millipore® de 0,22 µm de abertura e injetadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão

(HPSEC) (Waters) acoplado a refratômetro diferencial Waters 2410 (RI) e sistema de espalhamento de luz laser multiângulos, “Wyatt technology Dawn-F Multi-Angle” (MALLS). A fase móvel foi preparada com solução de 0,2 mol/L de  $\text{NaNO}_2$  e 200 ppm de  $\text{NaN}_3$ . A solução salina obtida foi filtrada em sistema Sartorius com membrana Millipore® de 0,22  $\mu\text{m}$  de abertura e o fluxo do solvente foi de 0,6 mL/min. Foram utilizadas quatro colunas Ultrahydrogel (7,8 x 300 mm) 120, 250, 500 e 2000, com limites de exclusão de  $5 \times 10^3$ ,  $8 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^5$  e  $7 \times 10^6$ , respectivamente. Todas as análises foram conduzidas a 25°C. Os dados obtidos em HPSEC foram coletados e analisados pelo programa Astra (Wyatt Technology) (Kai & Petkowicz, 2010).

#### *Aplicação da farinha de bagaço de malte em pães*

Estudos preliminares foram realizados e o nível de 12g/100g de substituição da farinha de trigo por farinha de bagaço de malte foi estabelecido.

Após avaliação do processo de hidrólise em extrusor, o tratamento com EP 1,0% foi selecionado, com base no maior teor de xilose apresentado. A farinha resultante foi aplicada na formulação de pães. Para efeito de comparação, pães foram desenvolvidos, também, com emprego de bagaço de malte não tratado (BNT), sem adição de enzimas, e com a adição destas diretamente à massa, na mesma concentração do tratamento selecionado (FT+BNT+EP1,0%). Os tratamentos foram codificados de acordo com a Tabela 1.

**Tabela 1 –** Codificação das formulações das farinhas compostas (12 % de substituição em relação à farinha de trigo (FT)), em função do tipo de bagaço utilizado - tratado (BT) ou não tratado (BNT), do tipo e teor de enzima adicionado e do momento da adição.

<b>Codificação<sup>a</sup></b>	<b>Descrição</b>
<b>FT+BNT</b>	Formulação com farinha de bagaço de malte sem tratamento (Controle)
<b>FT+BT(EP1,0%)</b>	Formulações com farinha de bagaço de malte tratada enzimaticamente em extrusor
<b>FT+BNT+EP1,0%</b>	Formulações com farinha de bagaço de malte sem tratamento e adição de enzima diretamente na massa

FT – Farinha de trigo

BNT – Bagaço de malte não tratado.

BT- Bagaço de malte tratado

EP - Enzima Pentopan Mono BG® (xilanases)

EC - Enzima Celluclast BG® (mistura de enzimas contendo celulase, xilanase e  $\alpha$ -amilase)

### *Propriedade de mistura das farinhas*

As características farinográficas da farinha de trigo e das farinhas compostas foram determinadas em farinógrafo Brabender® pelo método 54-21 da AACCC (AACCC, 1995) para avaliar os parâmetros de mistura e de processamento da farinha.

### *Otimização do processo de panificação*

Testes de panificação foram realizados de duas formas diferentes. A mistura da massa foi realizada em duas etapas e de duas formas distintas, modificando a ordem de adição da farinha de bagaço de malte e da gordura. Foi utilizado para a homogeneização da massa, uma batedeira Oster (Mix Master OS2700, Sunbeam Products Inc.) com 550 watts de potência. A formulação utilizada foi padronizada para 100g de farinha composta (com 12% de substituição da farinha de trigo por farinha de bagaço de malte), açúcar (7%), sal (1,75%), gordura vegetal hidrogenada (2%), fermento biológico seco (1,25%), emulsificante SSL (estearoil-2-lactil lactato de sódio) (0,5%) e conservador propionato de cálcio (0,2%), sendo as porcentagens dos ingredientes calculadas em relação ao peso da farinha composta. a) A mistura foi realizada na seguinte ordem: farinha composta, açúcar, sal, gordura, emulsificante, conservador e água (4°C), sob velocidade alta, por 5 minutos, seguida de adição do fermento e, quando específico da formulação, adição da enzima, sendo esta segunda mistura realizada sob velocidade lenta, por 5 minutos. b) A segunda forma de obtenção da massa foi realizada adicionando-se na mistura rápida por cinco minutos, 88% de farinha de trigo, água (4°C), açúcar (7%), sal (1,75%), gordura vegetal hidrogenada (1%), emulsificante SSL (estearoil-2-lactil lactato de sódio) (0,5%), e conservador propionato de cálcio (0,2%), sendo as porcentagens dos ingredientes calculadas em relação ao peso da farinha composta. Sob velocidade lenta, por cinco minutos, foram adicionados os ingredientes, farinha de bagaço de malte (12%), gordura vegetal hidrogenada (1%), fermento biológico seco (1,25%) e quando específico da formulação, enzima na proporção pré-definida.

Após o término da mistura, fez-se intervalo de 10 minutos de descanso e amostras de 100g de massa foram colhidas, passadas em cilindro

com abertura de 1mm por duas vezes, modeladas manualmente e enformadas em formas de 80mm de comprimento e 40mm de largura. A fermentação foi realizada em ambiente controlado (80% UR, 37°C), por tempo determinado (60, 75 e 90 minutos). O assamento foi realizado a 220°C por 30 minutos. Os pães obtidos foram resfriados à temperatura ambiente, embalados em sacos de polietileno e armazenados a temperatura ambiente em local seco e arejado por 24 horas.

Para cada formulação, um delineamento experimental completo (2<sup>2</sup>) foi utilizado, com duas variáveis e dois níveis, mais duas replicatas no ponto central, totalizando 6 experimentos. As duas variáveis estudadas foram quantidade de água adicionada e tempo de fermentação. Condições experimentais para água variaram de acordo com a absorção pré-definida em farinógrafo para cada formulação e padronizada como ponto máximo (+1), onde pontos central e mínimo foram representados por diminuição de 5% e 10%, respectivamente, deste valor. O tempo de fermentação foi definido com ponto central em 75 minutos, e máximo e mínimo de 60 e 90 minutos, respectivamente (Tabela 2). O planejamento experimental está apresentado na Tabela 3.

**Tabela 2 – Variáveis independentes e diferentes níveis.**

Variáveis independentes	Códigos e valores		
	-1	0	+1
Quantidade de água (mL/100g)	65	68,5	72
Tempo de fermentação (min)	60	75	90

**Tabela 3 –Planejamento experimental completo (2<sup>2</sup>)**

Ensaio	Tempo de fermentação (min)	Quantidade de água (mL/100g)
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5(C)	0	0
6(C)	0	0

## *Avaliação dos pães*

### **a. Textura dos pães**

A textura dos pães foi avaliada de acordo com o método modificado da AACC 74-09 (AACC, 1995), utilizando um texturômetro TA-XT2i (Stable Micro System, Inglaterra). Após estocagem por 24 horas, os pães foram fatiados (10 mm de espessura), as fatias externas de ambas as laterais foram descartadas e o miolo de cada fatia foi cortado com molde de 40 mm de diâmetro, descartando as cascas. As amostras foram comprimidas até 40% da altura com *probe* cilíndrico de 35 mm de diâmetro, velocidade de pré-teste, teste e pós-teste de 5,0 mm/s, 2,0 mm/s e 5,0 mm/s, respectivamente. Para cada pão, quatro repetições foram realizadas, utilizando as fatias centrais.

### **b. Volume específico dos pães**

Após o resfriamento dos pães em temperatura ambiente, o volume foi determinado pela técnica de deslocamento de sementes. O volume específico foi calculado pela razão entre o volume e seu peso (mL/g).

## 3 Resultados e Discussão

### Efeito do processo bioreativo nos polissacarídeos presentes no bagaço de malte

Duas frações de arabinoxilanas solúveis em água (AX-SA) foram obtidas: fração 0%, a qual não sofreu precipitação alcoólica, e a fração precipitada com solução alcoólica 65%. A composição de cada fração está apresentada na Tabela 4. Considerando que estas frações não foram obtidas de extratos de arabinoxilana purificados, pode-se observar uma elevada quantidade de glicose presente, a qual pode ser resultante da hidrólise de celulose, amido ou  $\beta$ -glucana. Além desta, os monossacarídeos que estiveram presentes em maior quantidade, em ambas as frações (0% e 65%) e em todos os tratamentos, foram arabinose e

xilose. Galactose, manose, ramnose e ribose também estiveram presentes, porém em quantidades menores (resultados de testes preliminares).

Elevadas quantidades de xilose e arabinose confirmam a presença de arabinoxilanas de caráter solúvel nos extratos aquosos obtidos de todos os tratamentos. Quando tratamento bioreativo foi aplicado no bagaço de malte (BT), pode-se observar maior teor de xilose presente na fração 0%, comparado ao do BNT, resultante da ação das endoxilanas. Segundo Courtin e Delcour (2002), quando a razão entre A/X for maior que 0,43, arabinoxilanas podem ser divididas em frações com diferente solubilidade, e isto foi observado no presente trabalho.

**Tabela 4** – Composição em monossacarídeos dos extratos aquosos de bagaço de malte não tratado (BNT) e tratado (BT) com diferentes tipos e concentrações de enzimas.

		Composição de monossacarídeos(%) <sup>a</sup>				
		Ara	Xil	Gli	AX	A/X
F 0% <sup>b</sup>	<b>BNT</b>	21,93	30,78	43,62	46,38	0,71
	<b>BT(EP1,0%)</b>	25,70	46,15	26,62	63,22	0,56
	<b>BT(EP5,0%)</b>	21,93	36,45	39,71	51,37	0,60
	<b>BT(EC1,0%)</b>	26,02	41,23	31,63	59,17	0,63
	<b>BT(EC5,0%)</b>	26,70	34,18	30,55	53,57	0,78
F65% <sup>b</sup>	<b>BNT</b>	33,67	42,29	18,46	66,84	0,80
	<b>BT(EP1,0%)</b>	36,37	35,00	24,23	62,81	1,04
	<b>BT(EP5,0%)</b>	29,75	28,82	35,58	51,54	1,03
	<b>BT(EC1,0%)</b>	28,59	29,76	18,73	51,35	0,96
	<b>BT(EC5,0%)</b>	32,01	26,22	32,00	51,24	1,22

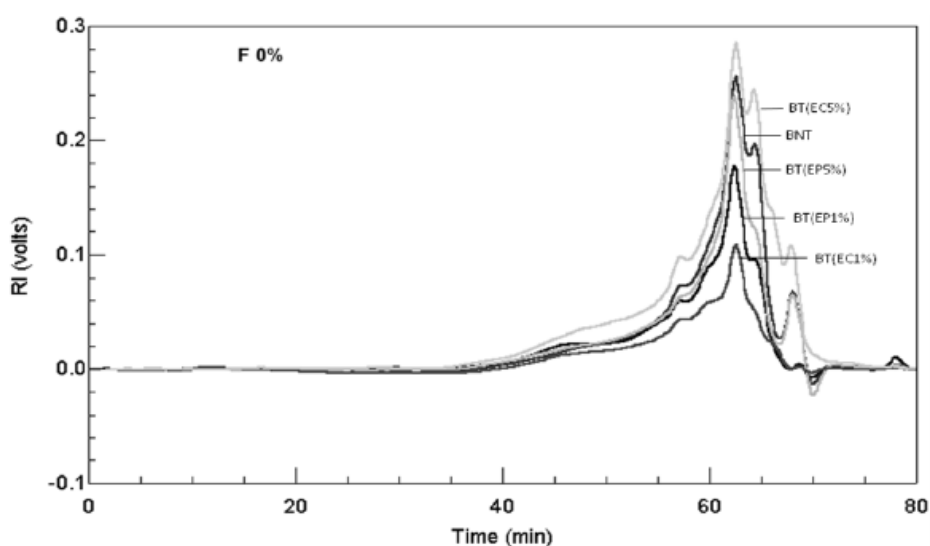
<sup>a</sup> Abreviações: Ara = arabinose; Xil = xilose; Gli = glicose; AX = arabinoxilana=  $0,88 (\%Ara + \%Xyl)$ , (Swennen, Courtin, der Bruggen, Vandecasteele e Delcour, 2005); A/X, razão entre arabinose e xilose

<sup>b</sup> F 0%= fração extrato solúvel ; F65%= fração precipitada com solução alcoólica 65%

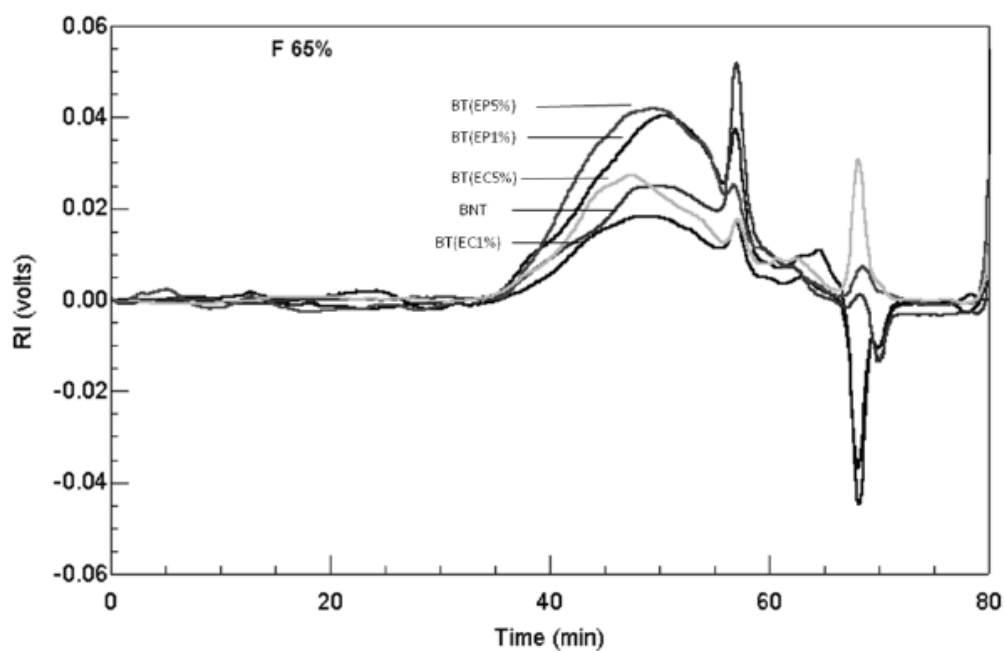
Pode-se observar que houve um aumento da razão A/X quando o fracionamento com solução de etanol em alta concentração (65%) foi aplicado e estes resultados estão de acordo com Dervilly, Saulnier, Roger e Thibault (2000). O aumento da razão A/X revela a heterogeneidade das arabinoxilanas, e segundo, os autores, isso se deve ao fato de que, nessas condições, frações solúveis de AX tendem a agregar-se e precipitar.

Em ambas as frações avaliadas, o alto valor de substituição das cadeias de xilose por resíduos de arabinose foi similar ao dos resultados apresentados por Dervilly et al (2002), para polissacarídeos solúveis em água de cevada e malte.

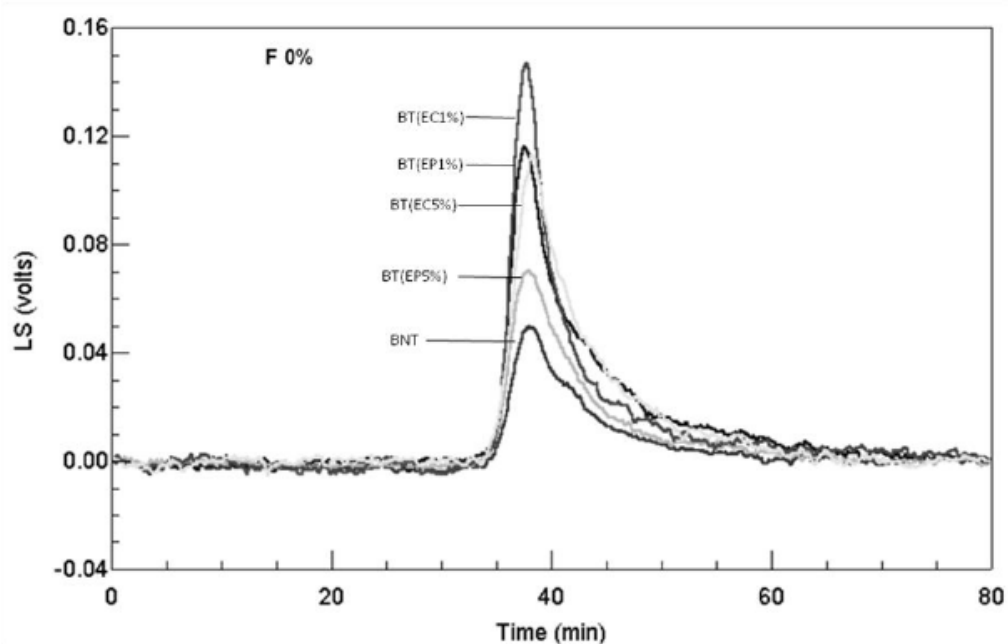
Figuras 1-2 e 3-4 mostram a evolução dos sinais dos detectores de índice de refração (RI) e sistema de espalhamento de luz laser multiângulos (MALLS) como uma função do tempo de eluição das frações obtidas dos extratos solúveis, sem precipitação e precipitadas em solução de alto teor alcoólico.



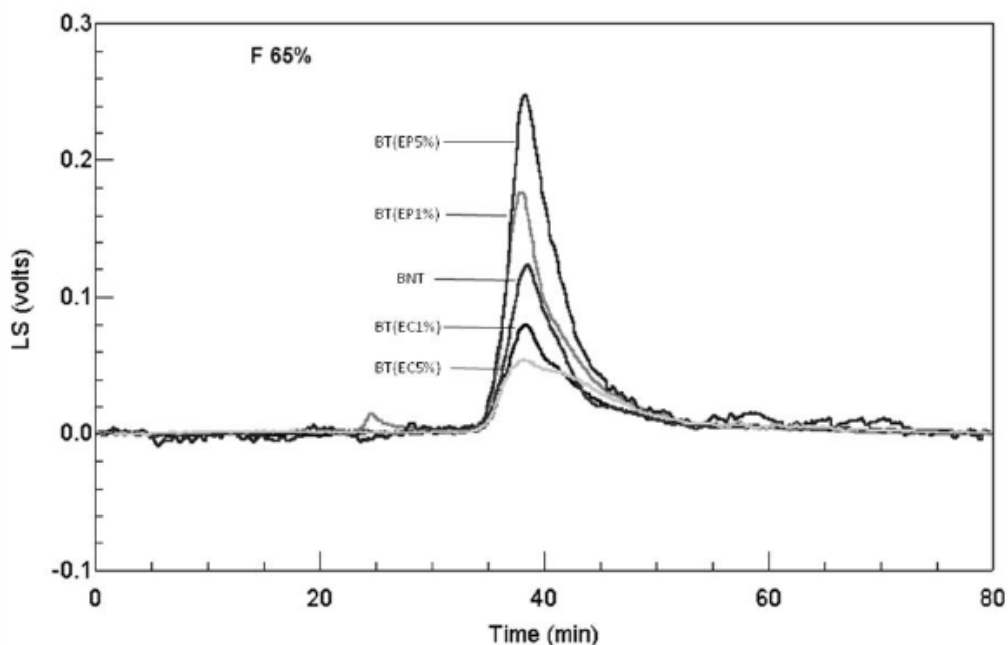
**Figura 1** – Perfil de HPSEC-detector RI (índice de refração) da fração 0% de extratos solúveis de farinha de bagaço de malte.



**Figura 2** – Perfil de HPSEC-detector RI (índice de refração) da fração 65% de extratos solúveis de farinha de bagaço de malte.



**Figura 3** – Perfil de HPSEC-detector MALLS (espalhamento de luz laser multiângulos) da fração 0% de extratos solúveis de farinha de bagaço de malte.



**Figura 4** – Perfil de HPSEC-detector MALLS (espalhamento de luz laser multiângulos) da fração 65% de extratos solúveis de farinha de bagaço de malte.

Apesar de não ter sido possível padronizar as escalas nos gráficos, pode-se realizar as seguintes observações. Como mostrado nas Figuras 1 e 2, os extratos obtidos dos tratamentos não apresentaram homogeneidade. Quatro picos distintos foram detectados em cada cromatograma.

Na fração 0%, observa-se que no detector RI (Figura 1) houve a formação de um pico muito pequeno próximo de 40 min e um pico maior formado a aproximadamente 60 min. No entanto, a inexistência de pico no MALLS neste tempo de eluição (60 min) (Figura 3), indica que são compostos de muito baixo peso molecular.

Já na fração 65%, observa-se o primeiro pico logo após 40 min de eluição, o qual corresponde à maior parte da amostra. A amostra apresenta picos largos, provavelmente, devido a mistura de compostos (Figura 2).

O detector RI reflete a concentração de compostos, enquanto que MALLS depende tanto da concentração, quanto do peso molecular (Majdoub et al., 2001).

Picos largos de MALLS indicam polímeros de alto peso molecular. Dessa forma, na fração 0%, os tratamentos com 1% de ambas as enzimas, BT(EC1,0%) e BT(EP1,0%), foram os que apresentaram compostos de maior

peso molecular. O bagaço de malte não tratado (BNT) foi o que apresentou polímeros de menor peso molecular nessa fração (Figura 3). Na fração 65%, o tratamento BT(EP5,0%) foi o que se destacou, seguido por EP1,0%, e os menores picos foram observados para os tratamentos BT(EC1,0%) e BT(EC5,0%) (Figura 4).

#### *Aplicação em panificação e otimização do processo*

De acordo com os dados obtidos na composição de monossacarídeos, o tratamento BT(EP1,0%) foi o que apresentou a maior quantidade de xilose, e por isso, foi selecionado para os testes em panificação.

Na tabela 5 estão apresentados os parâmetros farinográficos da farinha de trigo empregada na produção dos pães, assim como também os das farinhas compostas obtidas pela substituição de 12% da farinha de trigo por bagaço de malte tratado e não tratado.

**Tabela 5 –** Parâmetros farinográficos da farinha de trigo (FT) e das farinhas compostas, com FT+12% de bagaço de malte não tratado (BNT) e FT + 12 % de bagaço de malte tratado (BT), empregadas nos testes de panificação

Amostra	Farinografia			
	Absorção de água (%)	Tolerância a mistura (UF)	Tempo de desenvolvimento de massa (min)	Estabilidade (min)
<b>FT</b>	63,7	15	8,0	15,2
<b>FT+BNT</b>	72,3	20	9,5	5,8
<b>FT+BT(EP1,0%)</b>	71,9	25	10,0	6,7

FT – Farinha de trigo

BNT – Bagaço de malte não tratado.

BT- Bagaço de malte tratado

EP - Enzima Pentopan Mono BG® (xilanases)

EC - Enzima Celluclast BG® (mistura de enzimas contendo celulase, xilanase e  $\alpha$ -amilase)

A farinha composta contendo bagaço de malte tratado com EP, FT+BT(EP1,0%), absorveu cerca de 13% de água a mais, quando comparada à farinha de trigo. Também a farinha que continha BNT teve absorção de água superior à da FT.

Segundo Courtin e Delcour (2002), em panificação, arabinoxilanas podem aumentar significativamente a absorção de água, pela formação de pontes de hidrogênio com as estruturas não-substituídas de xilose, além de reduzir a elasticidade da massa, tornando-a mais extensível.

Arabinoxilanas de caráter insolúvel e outras fibras também interferem na formação do glúten, competindo por água e alterando as condições para o desenvolvimento da rede protéica.

A incorporação de alto conteúdo de fibras, pela adição do bagaço de malte, afetou as propriedades reológicas da massa (Tabela 5). As massas das farinhas compostas apresentaram maior tolerância à mistura, maior tempo de desenvolvimento e menor estabilidade quando comparadas à de farinha de trigo.

A importância da mistura da massa está em homogeneizar os ingredientes, expondo as superfícies das partículas da farinha permitindo uma interação com a água e hidratação. Durante o tempo de mistura, partículas vão perdendo sua identidade e a massa ganha uma aparência homogênea. O desenvolvimento da massa, resultante do aumento de sua consistência é acompanhado pela observação da força requerida durante a mistura.

O tratamento do bagaço com enzimas afetou os parâmetros farinográficos da farinha mista quando comparados aos da que continha bagaço sem tratamento, diminuindo a absorção de água e aumentando a tolerância à mistura, tempo de desenvolvimento e estabilidade (Tabela 5).

A partir das condições experimentais avaliadas, foram estabelecidos os modelos de regressão e a significância de cada modelo ( $p < 0.05$ ) para as propriedades dos pães avaliadas (Tabelas 6 e 7).

**Tabela 6** – Modelo de regressão e coeficiente de determinação para a dureza de pães elaborados com diferentes farinhas mistas, com diferentes condições de processo (R = mistura da farinha de bagaço de malte no processo rápido, L= mistura da farinha de bagaço de malte no processo lento)

Tratamentos	Dureza =	R <sup>2</sup>
<b>FT+BNT R</b>	23,2755-3,0267 t <b>-9,8214</b> w +1,7299 t.w	0,96
<b>FT+BNT L</b>	11,5923-2,6547 t -3,3247 w +0,4727 t.w	0,93
<b>FT+BNT+EP1,0% R</b>	18,0592+0,5916 t -4,3188 w -0,2501 t.w	0,59
<b>FT+BNT+EP1,0% L</b>	11,3544-2,6431 t -3,9882 w +0,6198 t.w	0,89
<b>FT+BT(EP1,0%) R</b>	18,5845-1,2750 t <b>-7,3732</b> w +0,7274 t.w	0,94
<b>FT+BT(EP1,0%) L</b>	11,1561-2,5787 t <b>-4,0920</b> w +0,7767 t.w	0,94

Modelos de regressão elaborados com o emprego de variáveis codificadas; t, tempo de fermentação; w, quantidade de água adicionada. Valores em negrito representam variáveis significativas.

**Tabela 7** – Modelo de regressão e coeficiente de determinação para o volume específico de pães elaborados com diferentes farinhas mistas, com diferentes condições de processo (R = mistura da farinha de bagaço de malte no processo rápido, L= mistura da farinha de bagaço de malte no processo lento)

Tratamentos	Volume específico =	R <sup>2</sup>
<b>FT+BNT R</b>	2,2881+0,1003 t <b>+0,3445</b> w +0,0574 t.w	0,98
<b>FT+BNT L</b>	2,8715+0,3014 t +0,2802 w +0,0920 t.w	0,89
<b>FT+BNT+EP1,0% R</b>	2,6767+0,2271 t +0,5172 w +0,0834 t.w	0,66
<b>FT+BNT+EP1,0% L</b>	2,9621+0,2383 t <b>+0,4421</b> w +0,1142 t.w	0,97
<b>FT+BT(EP1,0%) R</b>	2,6094+0,0897 t <b>+0,4650</b> w +0,1149 t.w	0,81
<b>FT+BT(EP1,0%) L</b>	2,9711+0,2167 t <b>+0,3475</b> w +0,1061 t.w	0,91

Modelos de regressão elaborados com o emprego de variáveis codificadas; t, tempo de fermentação; w, quantidade de água adicionada. Valores em negrito representam variáveis significativas.

De um modo geral, os coeficientes de determinação foram altos (> 0,80) e a falta de ajuste foi sempre não significativa. Apenas o modelo do tratamento FT+BNT+EP1,0% R teve um R<sup>2</sup> muito baixo (0,59) para a dureza(Tabela 6). Também foi observado no tratamento FT+BNT+EP1,0% R , para o volume específico, um R<sup>2</sup> igual a 0,66 (Tabela 7).

Não houve influência significativa do tempo de fermentação na dureza (Tabela 6 e 7). Para as formulações FT+BNT R; FT+BT(EP1,0%) R e FT+BT(EP1,0%) L houve influência significativa do efeito linear da quantidade de água adicionada(Tabela 6). Nas demais formulações, este efeito sempre foi

importante. Em todos os casos, o efeito foi negativo, indicando que quanto maior a quantidade de água adicionada, menor será a dureza do pão, o que é desejável.

As superfícies de resposta apresentadas na Figura 5 foram obtidas através dos modelos de regressão nos quais pelo menos uma das variáveis teve efeito significativo. Estas mostram a variação da dureza dos pães em função da quantidade de água adicionada e do tempo de fermentação a que foram submetidas as massas elaboradas com os dois tipos de processamento. Dentre estas formulações, FT+BT(EP1,0%) L (letra f da Figura 5) foi a que apresentou os menores valores de dureza, variando de 4 N, nas condições de tempo de fermentação (t) de 90 min. (+1) e quantidade de água adicionada (w) de 72 mL (+1), a 20 N, quando t= -1 e w = -1. Os maiores índices de dureza foram observados na formulação FT+BNT R (letra a da Figura 5), entre 15 N (quando o teor de água e tempo de fermentação tiveram os valores mais altos) e 40 N (para os menores valores das variáveis independentes).

Com exceção de FT+BNT+EP1,0%, todos os pães que receberam a farinha de bagaço de malte no processo de mistura rápida (R) foram influenciados, significativamente, pela quantidade de água, no volume específico. Pode-se observar que, quanto maior a quantidade de água adicionada, maior é o volume específico (Tabela 7), conseqüentemente, menor a densidade e mais leves os pães.

De acordo com Oomah e Leftovitch (1988), o volume específico de pães integrais pode ser otimizado com o aumento da quantidade de água adicionada.

Segundo Zhang, Lucas, Doursat, Flick e Wagner (2007), durante o processo de assamento dos pães, a crosta é formada à medida em que se processa a evaporação. Se por algum motivo, o processo de evaporação for impedido de continuar, haverá restrição à expansão da massa, não existirá aumento do volume dos pães, e conseqüentemente, ocorrerão prejuízos de textura. Esse fenômeno também pode explicar o fato de que em condições adversas, onde baixa quantidade de água foi adicionada (-1), provocando diminuição da água livre, os pães se apresentaram com qualidade indesejável.

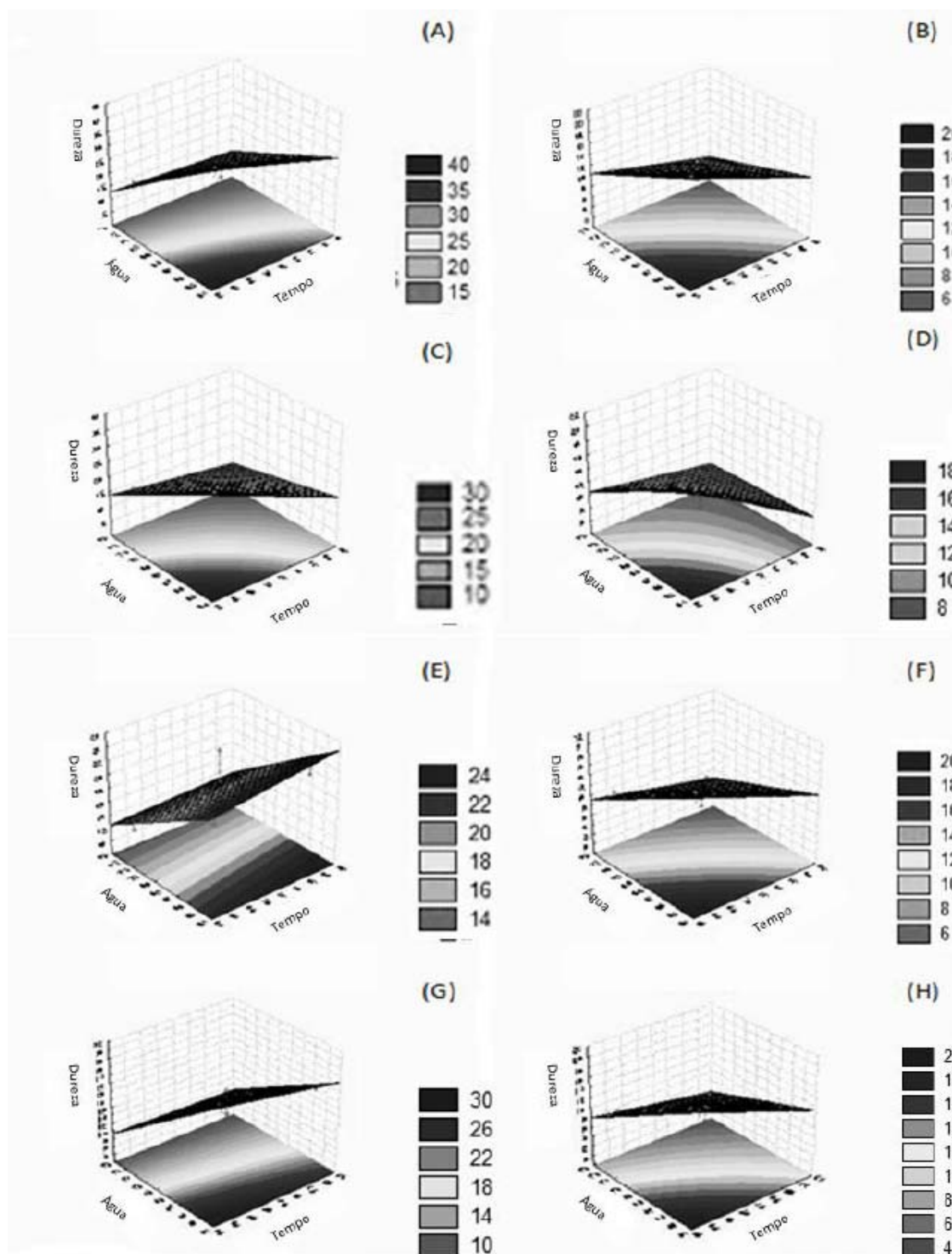
No processo rápido de mistura e para as formulações desenvolvidas com bagaço de malte tratado (FT+BT(EP1,0%) e não tratado com adição de enzima na massa (FT+BNT+EP1,0%) foram observados índices de

dureza 10 N e 12 N, e no processo lento, 4 N e 6 N, respectivamente. Ambos, nas condições de maior teor de água e maior tempo de fermentação. Observou-se que o bagaço de malte modificado por extrusão e pela ação enzimática (FT+BT(EP1,0%)) resultou em pães com dureza menor no dois processos de mistura aplicados (R ou L).

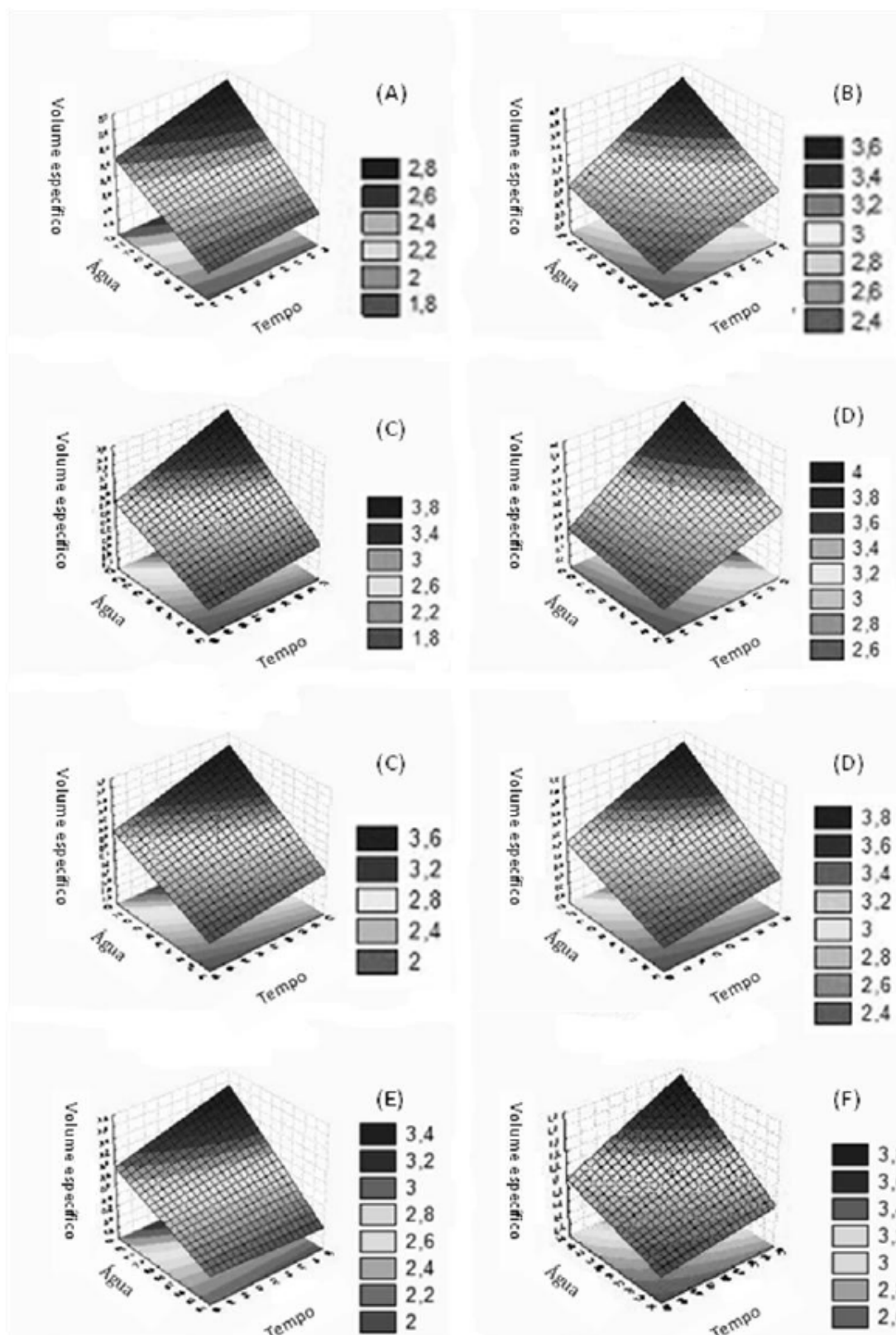
Para volume específico (Figura 6), FT+BT(EP1,0%) e FT+BNT+EP1,0% apresentaram valores de 3,4 mL/g e 3,6 mL/g, para o processo rápido, respectivamente, e de 3,8 mL/g para o processo lento, em ambas as formulações e nas condições +1 das variáveis estudadas.

A formulação desenvolvida com bagaço de malte não tratado (FT+BNT) apresentou os maiores índices de dureza e menor volume específico dentre as formulações desenvolvidas no processo rápido de mistura. No entanto, no processo lento, a dureza foi semelhante à do tratamento FT+BNT+EP1,0% e o volume específico foi levemente menor (3,6 mL/g) do que as demais formulações (3,8 mL/g).

De uma maneira geral, as superfícies de resposta (Figuras 5 e 6) mostraram que todos os pães tenderam a apresentar menor dureza e maior volume específico quando maiores quantidades de água foram adicionadas e tempos mais longos de fermentação aplicados. Além disso, pode-se observar que os pães que receberam a farinha de bagaço no processo lento de mistura (L), adicionadas juntamente com metade da quantidade de gordura, tiveram menor dureza e maior volume específico. Isso pode ser explicado pelo fato de que houve ligeira impermeabilização provocada pela gordura nas fibras, além de que a rede de glúten formada pode ter se tornado mais resistente pela ausência de outras partículas que poderiam romper a estrutura da rede protéica.



**Figura 5** – Superfície de resposta de dureza de pães desenvolvidos com bagaço de malte (A) FT+BNT R (B) FT+BNT L; (C) FT+BNT-EP1,0% R; (D) FT+BNT-EP1,0% L; (E) FT+BT(EP1,0%) R; (F) FT+BT(EP1,0%) L



**Figura 6** – Superfície de resposta de volume específico de pães desenvolvidos com bagaço de malte. (A) FT+BNT R (B) FT+BNT L; (C) FT+BNT+EP1,0% R; (D) FT+BNT+EP1,0% L; (E) FT+BT(EP1,0%) R; (F) FT+BT(EP1,0%) L.

#### 4 Conclusão

A composição monossacarídica obtida dos tratamentos realizados em bagaço de malte com concentrações de 1 e 5% de enzimas Pentopan Mono BG® e Celluclast BG sugerem a presença de arabinoxilanas estruturais. O tratamento enzimático em extrusor como bioreator que apresentou a maior eficiência na produção de resíduos de xilose foi o que empregou a enzima EP com concentração de 1% (BT(EP1,0%)), porém, a razão A/X mais elevada foi observada no tratamento com 5% de EC (BT(EC5,0%)) indicando a presença de arabinoxilanas com maior grau de substituição das cadeias de xilose por resíduos de arabinose.

Como os tratamentos analisados em HPSEC-MALLS não passaram por nenhum processo de purificação, já era esperado que as amostras não apresentassem homogeneidade. No entanto, a análise foi de grande valia para se observar a concentração e a distribuição do peso molecular dos compostos presentes, comparativamente.

Deve-se levar em consideração que nestes extratos, estão presentes estruturas formadas por monômeros de glicose, como por exemplo, celulose ou  $\beta$ -glucana. E como não há distinção quanto à conformação da estrutura em picos de MALLS, apenas a detecção de peso molecular, os picos podem estar representando outros polissacarídeos presentes. Porém, sabendo que em soluções de alto teor alcoólico, compostos de menor peso molecular precipitam, e considerando que os extratos analisados foram obtidos da fração solúvel das farinhas de bagaço de malte enzimaticamente tratadas, observa-se que houve hidrólise em todos os tratamentos, com maior efetividade em BT(EC1,0%) e BT(EC5,0%), os quais apresentaram os menores picos, indicando compostos de menor peso molecular, com elevado grau de substituição obtido pela razão A/X, sugerindo a presença de arabinoxilanas de caráter solúvel.

Na região experimental estudada para otimização do processo de panificação, as condições mais recomendadas foram: maior quantidade de água (72 mL) e maior tempo de fermentação (90 min). Além disso, a condição de processo que forneceu pães com menor dureza e maior volume específico foi àquela na qual a farinha de bagaço de malte foi adicionada à massa no segundo processo de mistura, de forma lenta. Nessas condições, houve pouca diferença

entre as características dos pães formulados com bagaço de malte tratado ou não tratado.

Em síntese, os resultados demonstraram que o processo bioreativo é eficiente na modificação das arabinoxilanas presentes no bagaço de malte na região estudada, mas que esta modificação não apresentou vantagens quando o processo de panificação foi otimizado.

## **CAPÍTULO V**

## 5 CONCLUSÃO GERAL

O bagaço de malte é um resíduo industrial que pode ser destinado à alimentação humana devido ao seu elevado teor de proteínas e, principalmente de fibras.

O processo de hidrólise enzimática com endoxilanasas, utilizando extrusor como biorreator, aplicado em bagaço de malte, é um método, além de inovador, eficiente e prático para modificação das cadeias de arabinoxilanas.

O aumento da solubilidade e a diminuição da capacidade de retenção de água das farinhas de bagaço de malte obtidas nos diferentes tratamentos avaliados, demonstrou que houve modificação deste produto. O tratamento de melhor desempenho na obtenção de arabinoxilanas enzimaticamente solubilizadas foi o da utilização da enzima “Celluclast BG®” (EC) na concentração de 5,0%.

Em panificação, no processo padronizado, não houve diferença significativa entre os pães desenvolvidos com bagaço de malte não tratado (BNT) e tratado (BT). O tratamento FT+BT(EC5,0%) causou tendência a uma menor dureza dos pães, porém, pães que receberam a enzima diretamente à massa apresentaram os melhores resultados. No entanto, esse tratamento não foi selecionado para avaliação da otimização do processo. Optou-se por selecionar o tratamento FT+BT(EP1,0%) com base nos resultados que mostraram que, apesar das diferenças na ação enzimática entre EP e EC (evidenciadas na composição em monossacarídeos) não houve diferenças significativas nas características dos pães obtidos com os bagaços tratados por uma ou outra. Além disso, os resultados apresentados mostraram que este tratamento (BT(EP1,0%)) foi o que resultou na maior quantidade de xilose contrariando o resultado com base na quantificação de açúcares redutores, que indicou a presença de baixos índices de Xil.

No processo otimizado de panificação, quando se empregou a adição do bagaço em mistura lenta, pode-se observar que tanto para os valores de menor dureza do pão, como para os de maior volume específico houve apenas ligeira diferença entre os diferentes tratamentos. Com base nisso, concluiu-se que o processo de panificação interferiu na qualidade dos produtos obtidos. Assim, as

vantagens conferidas pela modificação enzimática, em relação ao BNT, foram equiparadas pelo efeito positivo da modificação do processo de mistura.

## **CAPÍTULO VI**

## **6 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS**

Estudos avaliando a aplicação do bagaço de malte tratado com Celluclast 5,0% em pães, no processo otimizado, fazem-se necessários, para se observar o efeito deste tratamento, já que o aumento da hidrólise de cadeias de arabinoxilanas pode surtir efeito negativo em pães, como decorrência da perda da capacidade de formação de soluções viscosas.

## REFERÊNCIAS

- AACC, AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS *Approved methods of AACC*. 9.ed. St. Paul, 1995.
- AMAN, P.; NEWMAN C. W. Chemical composition of some different types of barley grown in Montana, U.S.A. *Journal Of Cereal Science*, v.4, p.133-141, 1986.
- ANDERSON, R.A. et al. Gelatinization of corn grits by roll-and extrusion cooking. *Cereal Science Today*, v.14, n.4, p. 4- 12, 1969.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.;POUTANEN, K. International testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, v.23, p.257–270, 1992.
- BEBER, R. C. *Caracterização física e química de genótipos brasileiros de Avena Sativa L: influência genética e ambiental*. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1996.
- BHATTY, R. S. The potential of hull-less barley. *Cereal Chemistry*, v.76, n.5, p.589-599, 1999.
- BHATTY, R. S.; ROSSNAGEL, B. G. Comparison of pearled and unpearled canadian and japanese barleys. *Cereal Chemistry*, v.75, n.1, p.15-21, 1998.
- BIELY, P. Microbial Xylanolytic Systems. *Trends in Biotechnology*, v.3, p.286–295, 1985.
- BLOKSMA, A. H. Dough structure, dough rheology, and baking quality. *Cereal Foods World*, v.35, p.237–244, 1990.
- BOTHMER, R. V.; JACOBSEN, N. Origin, Taxonomy and Related Species. In: RASMUSSEN, D. C. Barley. Madison, Wisconsin, Usa: *American Society Of Agronomy*, Crop Science Society Of America, Soil Science Of America, p.19-37, 1985.
- BRILLOUET, J.M. AND JOSELEAU, J.P. Investigation of the structure of a heteroxylan from the outer pericarp (beeswing bran) of wheat kernel. *Carbohydrate Research*, v.159, p.109–126, 1987.
- BRILLOUET, J.M. et al. Isolation, purification, and characterization of a complex heteroxylan from industrial wheat bran., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.30, p.488–494, 1982.
- BROWN, J. Advances in breadmaking technology. In KAMEL, B. S.; STAUFFER, C. E. (Ed.), *Advances in baking technology*. Glasgow: Blackie Academic and Professional, 1993. p.38–87.

BRASIL. Decreto n.º 2314, de 4 de setembro de 1997, Regulamenta a Lei No 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 19549, 5 set. 1997.

BRASIL. Lei n.º 8918, de 14 de julho de 1994, Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, autoriza a criação da Comissão Intersectorial de Bebidas e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 10661, 15 jul. 1994.

CABALLERO, P.A.; GOMEZ, M.; ROSELL, C.M. Improvement of dough rheology, bread quality and bread shelf-life by enzymes combination. *Journal of Food Engineering*, v.81, p.42–53, 2007.

CARPITA, N.; MCCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, p.52-108, 2000.

CHOCT, M. E KOCHER, A. Non-starch polysaccharides: Chemical structures and nutritional significance. *Feed Milling International*. June, p.13-26, 2000.

CLEEMPUT G. et al. Solubilisation and changes in molecular weight distribution of arabinoxylans and protein in wheat flours during bread-making, and the effects of endogenous arabinoxylan hydrolysing enzymes. *Journal of Cereal Science*, v.26, p.55–66, 1997.

COLLINS, T. et al. Use of glycoside hydrolase family 8 xylanases in baking *Journal of Cereal Science*, v.43, p.79–84, 2006.

COMISSÃO DE PESQUISA DE CEVADA *Indicações técnicas para produção de cevada cervejeira: safras 2001 e 2002..* Passo Fundo: Embrapa Trigo, v.80, 2001.

COURTIN, C. M.; DELCOUR, J. A. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. *Journal of Cereal Science*, v.35,p.225-243, 2002.

COURTIN, C.M., VAN DEN BROECK, H. AND DELCOUR, J.A. Determination of reducing end sugar residues in oligo- and polysaccharides by gas liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.866, p.97–104, 2000.

DE FRANCISCO, A. Relação entre a estrutura e função no grão da cevada In: MINELLA E. *Anais e ata da XXII reunião anual de pesquisa de cevada*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, p. 423-430, 2002.

DERVILLY, G. et al. Water- extractable arabinoxylan from pearled flours of wheat, barley, rye and triticale. Evidence for the presence of ferulic acid dimers and their involvement in gel formation. *Journal of Cereal Science*, v.34, p.207-214, 2001.

- DERVILLY, G. et al. Isolation and characterization of high molar mass water-soluble Arabinoxylans from barley and barley malt, *Carbohydrate polymers*, v.47, p.143-149, 2002.
- DERVILLY, G. et al. Isolation of homogeneous fractions from wheat water-soluble arabinoxylans. Influence of the structure on their macromolecular characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.270-278, 2000.
- DHIMAN, T. R.; BINGHAM, H. R.; RADLOFF, H. D. Production response of lactating cows fed dried versus brewers' grain in diets with similar dry matter content. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.2914-2921, 2003.
- DREESE, P. C.; HOSENEY, R. C. Baking properties of bran fraction from brewer's spent grains. *Cereal Chemistry*, v.59, p.89-91, 1982.
- DRESSE, P. C.; HOSENEY, R. C. Method of removing hulls from brewers' spent grain. *US patent 4*, v.377, p.601, 1983.
- DUNG, N. N. X.; MANH, L. H.; UDEN, P. Tropical fiber sources for pigs – digestibility, digesta retention and estimation of fiber digestibility *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, v.102, p.109-124, 2002.
- DUPONT, M.S. AND SELVENDRAN, R.R. Hemicellulosic polymers from the cell walls of beeswing wheat bran: Part I, polymers solubilised by alkali at 2°. *Carbohydrate Research*, v.163, p.99-113, 1987.
- EDNEY, M. J.; TKACHUK, R.; MACGREGOR, A. W. Nutrient Composition Of The Hull-Less Barley Cultivar, Condor. *Journal of the science of food and agriculture*, v.60, p.451-456, 1992.
- EL-DASH, A.A. Standardized mixing and fermentation procedure for experimental baking test, *Cereal Chemistry*, v.55, n.4, p.436-446, 1978.
- ENGLYST, H.N. AND CUMMINGS, J.H. Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by GLC of constituent sugars as alditol acetates, *Analyst*, v.109, p.937-942, 1984.
- FIGUEROA-ESPINOZA, M.C.; ROUAU, X. Oxidative cross-linking of pentosans by a fungal laccase and horseradish peroxidase: mechanism of linkage between feruloylated arabinoxylans. *Cereal Chemistry*, v.72, p.259-265, 1998.
- FINLEY, J. W.; HANAMOTO, M. M. Milling and baking properties of dried brewer's spent grains. *Cereal Chemistry*, v.57, p.166 – 168, 1980.
- FLANDER, L. et al. Optimization of ingredients and baking process for improved wholemeal oat bread quality, *LWT*, v.40, p.860-870, 2007.
- GORMLEY, T. R.; MORRISSEY, A. A note on the evaluation of wheat in breads containing oat flour or oat flakes. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, v.32, p.205-209, 1993.

GOVINDASAMY, S.; CAMPANELLA, O. H.; OATES, C. G. The single screw extruder as a bioreactor for sago starch hydrolysis. *Food Chemistry*, v.60, n.1, p.1-11, 1997.

GUTKOSKI, L. C.; PEDÓ, I. *Aveia: Composição Química, Valor Nutricional e Processamento*. São Paulo: Varela, 2000.

HALTRICH, D. et al. Production of fungal xylanases. *Bioresource Technology*, v.58, p.137 – 161. 1996.

HAN, J. Y., SCHWARZ, P. B. Arabinoxylan Composition in Barley, Malt, and Beer. *Journal of American Society Brewery Chemists*, v.54, n.4, p.216-220, 1996.

HOSENEY, R. C. Principles of cereal chemistry and technology. *American Association of Cereal Chemists, Inc., USA*, 1994.

HUNG, P. V.; MAEDA, T.; MORITA, N. Dough and bread qualities of flours with whole waxy wheat flour substitution, *Food Research International*, v.40, p.273–279, 2007.

ISHII, T. Review- Structure and functions of feruloylated polysaccharides, *Plant Science*, v.127, p.111-127, 1997.

IZYDORCZYK, M. S.; BILIADERIS, C. G. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties, *Carbohydrate Polymers*, v.28, p.33-48, 1995.

JORGE, K.; TRUGO, L. C. Discrimination of different hop varieties using headspace gas chromatographic data. *Journal of Brazilian Chemists Society*, v.14, n.3, p.411-415, 2003.

KANAUCHI, O.; MITSUYAMA, K.; ARAKI, Y. Development of a functional germinated barley foodstuff from brewers' spent grain for the treatment of ulcerative colitis. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v.59, p.59-62, 2001.

KAI, K. C.; PETKOWICZ, C. L. O. Influence of extraction conditions on properties of seed xyloglucan, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 46 n.2, p.223-228, 2010.

KATINA, K. et al. Effects of sourdough and enzymes on staling of high-fibre wheat Bread, *LWT*, v.39, p.479–491, 2006.

KENT, N. L. *Tecnología de los alimentos*. Zaragoza: Acribia.

KENT, N. L.; EVERS, A. D. (1994). *Kent's technology of cereals*. 4th ed. Oxford: Elsevier. P.191–217, 1987.

- LECAIN, A. NG. S. et al. Modification of cell-wall polymers of onion waste III. Effect of extrusion-cooking on cell-wall material of outer fleshy tissues. *Carbohydrate Polymers*, v.39, p.341-349, 1999.
- LEE, S.-H.; TERAMOTO, Y.; ENDO, T. Enzymatic saccharification of Woody biomass micro/nanofibrillated by continuous extrusion process I – Effect of additives with cellulose affinity. *Biosource Technology*, v.100, p.275-279, 2009.
- LEVINE, H. AND SLADE, L. Influence of the glassy and rubbery states on the thermal mechanical and structural properties of doughs and baked products. In FARIDI, H.; FAUBION, J.M. Dough rheology and baked products texture. New York, U.S.A.: Van Nostrand Reinhold, 1990. p. 157–330.
- LINKO, P.; LINKO, Y.-Y.; OLKKU, J. Extrusion cooking and bioconversion. Presented at the *Extrusion cooking* Symposium, 7th World Cereal and Bread Congress, Prague, 1982.
- LINKO, R. et al. Protein composition of a high-protein barley flour and barley grain. *Cereal Chemistry*, v.66, n.6, p.478-482, 1989.
- MACGREGOR, A. W.; FINCHER, G. B. Carbohydrates of the barley grain. In: MACGREGOR, A. W.; BHATTY, R. S. (Ed.). *Barley: Chemistry and technology*. St Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists, 1993. p. 73–130.
- MAJDOUB, H. et al. Prickly pear nopals pectin from *Opuntia ficus-indica* physico-chemical study in dilute and semi-dilute solutions, *Carbohydrate polymers*, v.46, p.69-79, 2001.
- MANDALARIA, G. et al. Fractionation and characterisation of arabinoxylans from brewers' spent grain and wheat bran, *Journal of Cereal Science*, v.42, p.205–212, 2005.
- MANDELS, M.; HONTZ, L.; NYSTROM, J. Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. *Biotechnology Bioengineer*, v.16, p.1471-1493, 1974.
- MEUSER, F.; SUCKOW, P. Non-starch polysaccharides. In: BLANSHARD, J. M. V.; FRAZIER, P. J.; GALLIARD, T (Ed.). *Chemistry and Physics of Baking*. London: The Royal Society of Chemistry, 1986. p.42-61.
- MICHNIEWICZ, J., BILIADERIS, C.G.; BUSHUK, W. Effect of added pentosans on some physical and technological characteristics of dough and gluten. *Cereal Chemistry*, v.68, p.252-258, 1991.
- MOHAMED, A.; RAYAS-DUARTE, P.; XU, J. Hard Red Spring wheat/C-TRIM 20 bread: Formulation, processing and texture analysis. *Food Chemistry*, v.107, p.516–524, 2008.
- MONDAL, A., DATTA, A.K. Bread baking: a review. *Journal of Food Engineering*, v.86, p.465–474, 2008.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, v.43, p.1-14, 2006.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I.C. Acid hydrolysis and fermentation of brewers' spent grain to produce xylitol. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.85, n.14, p.2453-2460, 2005.

NELSON, N. A photometric adaptation os Somogyi method for determination of glucose *Journal of Biological Chemistry*, v.135, n.1, p.136-175, 1944.

NEWELL, G.J.; MAC FARLANE, J.D. Expanded tables for multiple comparison procedures in the analysis of ranked data, *Journal of Food Science*, v.52, n.6, p.1721, 1987.

NILAN, R. A.; ULLRICH, S. E. Barley: Taxonomy, Origin, Distribution, Production, Genetics, and Breeding. In: MACGREGOR, A. W.; BHATTY, R. S. *Barley: Chemistry And Technology*. St. Paul, Minnesota, USA: American Association Of Cereal Chemists, 1993. p.1-5.

OOMAH, B. D.; LEFKOVITCH, L. P. Optimal oxidant requirement of wheat-oat composite flours. *Die Nahrung*, v.32, n.6, p.527-538, 1988.

OSCARSSON, M. et al. Chemical composition of barley samples focusing on dietary fibre components. *Journal of Cereal Science*, v.24, p.161-170, 1996.

ØSTERGÅRD, K.; BJÖRCK, I.; VAINIONPÄÄ, J. Effects of extrusion cooking on starch and dietary fibre in barley. *Food Chemistry*, p.215-227, 1989.

ÖZTÜRK, S.; ÖZBOY, Ö.; KÖKSEL, H. Effects on brewers' spent grain on the quality and dietary fiber of cookies. *Journal of Institute of Brewery*, v.108, n.1, p.23-27, 2002.

PERPÈTE, P.; COLLIN, S. How to improve the enzymatic worty flavour reduction in a cold contact fermentation. *Food Chemistry*, v.70, n.4, p.457-462, 2000.

REINOLD, M.R. Tecnologia de Microcervejarias. *Engarrafador Moderno*, v.66, p.58-64, 1999.

ROUAU, X. Investigation into the effect on an enzyme preparation for baking on wheat flour dough pentosans. *Journal of Cereal Science*. v.18, p.145-157, 1993.

SANGNARK, A.; NOOMHORM, A. Chemical, physical and baking properties of dietary fiber prepared from rice straw. *Food Research International*, v.37, p.66-74, 2004.

SANTOS, I. J.; COUTO, S. M.; OLIVEIRA, M. G. A. Perfil enzimático da cevada para produção de cerveja durante os processos de germinação e de secagem. *Engenharia Agricola*, v.21, n.3, p.283-292, 2001.

- SAULINER, L.; THIBAUT, J-F. Review- Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *Journal of Science Food Agricultural*, v.79, p.396-402, 1999.
- SCHOONEVELD-BERGMANS, M. E. F.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. Structural Features of (Glucurono)Arabinoxylans Extracted from Wheat Bran by Barium Hydroxide. *Journal of Cereal Science*, v.29, p.63–75, 1999.
- SGARBIERI, V. C. *Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações*. São Paulo: Varela, 1996.
- SHEWRY, P. R. Barley seeds proteins. In: MACGREGOR, A. W.; BHATTY, R. S. *Barley: Chemistry and technology*. St. Paul, Minnesota, Usa: American Association Of Cereal Chemists., 1993. p.1-5.
- SHEWRY, P. R.; MIFLIN, B. J.; KASARDA, D. D. The structural and evolutionary relationships of the prolamin storage proteins of barley, rye and wheat, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, p. 304 – 297, 1984.
- SHINDO, S.; TACHIBANA, T. Production of L-Lactic Acid from Spent Grain, a By-Product of Beer Production. *Journal of Institute of Brewery*, v.110, n.4, p.347–351, 2004.
- STATSOFT, Inc. Statistica for Windows - computer program manual. Tulsa (OK): StatSoft, 1999.
- STOJCESKA, V.; AINSWORTH, P. The effect of different enzymes on the quality of high-fibre enriched brewer's spent grain breads, *Food Chemistry*, v.110, p.865–872, 2008.
- STOJCESKA, V. et al. The recycling of brewer's processing by-product into ready-to-eat snacks. *Journal of Cereal Science*, v.47, n.3, p.469-479, 2008.
- STOJCESKA, V. et al. The effect of extrusion cooking using different water feed rates on the quality of ready-to-eat snacks made from food by-products. *Food Chemistry*, v. 114, p.226-232, 2009.
- SUNGURTAS, J. et al. Xylan-degrading enzymes and arabinoxylan solubilisation in barley cultivars of differing malting quality. *Journal of Cereal Science*, v.39, p.273–281, 2004.
- SWENNEN, K. et al. Ultrafiltration and ethanol precipitation for isolation of arabinoxylooligosaccharides with different structures, *Carbohydrate Polymers* v.62, p.283–292, 2005.
- TROGH, I. et al. The combined use of hull-less barley flour and xylanase as a strategy for wheat/hull-less barley flour breads with increased arabinoxylan and (1/3,1/4)-b-D-glucan levels. *Journal of Cereal Science*, v.40, p.257–267, 2004.

VENTURINI FILHO, W. G.; NOJIMOTO, T. Aproveitamento da água de umidificação de malte da moagem úmida como matéria prima na fabricação de cerveja, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.19, n.2, p.174-178, 1999.

VINKX, C.J.A.; DELCOUR, J.A. Rye (*Secale cereale L.*) arabinoxylan: a critical review. *Journal of Cereal Science*, v.24, p.1-14, 1996.

WANG, M-W, VAN VLIET, T.; HAMER, R.J. How gluten properties are affected by pentosans. *Journal of Cereal Science*, v.39, n.3, p.395-402, 2004.

WATANABE, N.; INAIDA, O.; KARAKAWA, T. New Approaches to Using Spent Brewer's Yeast, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v.38, n.1, p.5-8, 1980.

WILLIAMS, P. E. V., CHESSON, A. Cereal raw materials and animal production. In: PALMER, G. H. *Cereal Science and Technology*, Ed. Hyperion Books, 1989. 436 p.

ZGHAL, M. C., SCANLON, M. G.; SAPIRSTEIN, H. D. Prediction of bread crumb density by digital image analysis. *Cereal Chemistry*, v.76, p.734-742, 1999.

ZHANG, L. et al. Effects of crust constraints on bread expansion and CO<sub>2</sub> release. *Journal of Food Engineering*, v. 80, n.4, p.1302-1311, 2007.