

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS**  
**CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

**DENISE SILVA DE OLIVEIRA**

**APLICAÇÃO DE XILANASE E/OU CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE**  
**(CGTASE) NA PRODUÇÃO DE PÃES**

São José do Rio Preto-SP

2010

**DENISE SILVA DE OLIVEIRA**

**APLICAÇÃO DE XILANASE E/OU CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE (CGTASE)  
NA PRODUÇÃO DE PÃES**

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto

**Orientadora:**

Profa. Dra. Célia Maria Landi Franco  
Co-orientador: Dr. Roberto da Silva

São José do Rio Preto-SP

2010

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Célia Maria Landi Franco  
Universidade Estadual Paulista - UNESP  
Orientadora

---

Prof. Dra. Myriam Salas Mellado  
Universidade Federal do Rio Grande - FURS  
Membro da Banca

---

Prof. Dra. Caroline Joy Steel  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP  
Membro da Banca

---

Prof. Dra. Eleni Gomes  
Universidade Estadual Paulista - UNESP  
Membro da Banca

---

Prof. Dra. Mieko Kimura  
Universidade Estadual Paulista - UNESP  
Membro da Banca

São José do Rio Preto - SP  
2010

## Dedico

*A minha mãe, Maria Aparecida  
A meu pai, Carlos Augusto  
Aos meus irmãos, Adriana, Junior (in memoriam), Ana Beatriz  
Ao meu noivo, Adilson  
Ao meu cunhado André  
Ao meus sobrinhos, Maria Eduarda, João Guilherme  
A minha eterna orientadora, Fumie Suzuki Kemelmeier*

*Dessas pessoas recebi apenas energias positivas, apoio, compreensão, orientação, e incentivo  
para eu buscar minha própria realização. Toda a minha gratidão, muito obrigada*

## **AGRADECIMENTOS**

A Prof. Dra. Célia Maria Landi Franco, pela oportunidade, amizade e dedicação na orientação desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto da Silva, pela oportunidade, esclarecimentos e co-orientação desse trabalho.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Aline, Andréia, Carol, Ellen, Fabiana, Heloiza, Marcelo, Márcia, Natália, Rodrigo, que me receberam de braços abertos.

As colegas de trabalho do Laboratório de Cereais, Raízes e Tubérculos, Suelen, Veren, e principalmente Thaís e Raquel pela amizade, paciência e co-orientação não oficial.

As amigas, Analice, e Jupyracyara, pela amizade e apoio nos momentos difíceis.

Aos técnicos do Departamento de Engenharia de Alimentos, Ginaldo, Luiz e Tânia.

Ao colega Joel, pelo ajuda no manuseio do texturômetro.

Ao Laboratório de Cereais da Universidade Estadual de Campinas, por ceder os equipamentos farinógrafo e extensôgrafo.

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão de bolsa de doutorado e apoio financeiro a pesquisa.

## SUMÁRIO GERAL

	RESUMO.....	i
	ABSTRACT .....	ii
CAPÍTULO .1.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
CAPÍTULO .2.	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA XILANASE E PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE (CGTase)....	37
CAPÍTULO .3.	APLICAÇÃO DE XILANASE NA PRODUÇÃO DE PÃES .....	58
CAPÍTULO .4.	APLICAÇÃO DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE (CGTase) NA PRODUÇÃO DE PÃES.....	100
CAPÍTULO .5.	APLICAÇÃO DE XILANASE E CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE (CGTase) NA PRODUÇÃO DE PÃES .....	133
	RELATÓRIO DE ATIVIDADES .....	149

## RESUMO

O desenvolvimento da tecnologia de pães é um fenômeno de grande impacto na indústria de alimentos. Ao longo dos anos vários aditivos foram incorporados à tecnologia de panificação, elevando a qualidade destes produtos e fazendo crescer a sua aceitação pela população em geral. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos sobre a qualidade do pão e sobre o processo de envelhecimento, da adição de enzimas na massa. As enzimas usadas foram xilanase produzida pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 nas concentrações de 20, 35 e 50U/100 g de farinha de trigo e/ou da ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) produzida pela bactéria *Bacillus clausii* E16 nas concentrações de 15 e 30U/100 g de farinha de trigo, parcialmente purificadas. O mecanismo de ação dessas enzimas sobre os seus respectivos substratos arabinoxilana e amido, respectivamente, também foram avaliadas. Os pães adicionados de xilanase, CGTase e xilanase/CGTase foram produzidos em três etapas distintas. Para o estudo do envelhecimento os pães foram mantidos a temperatura de 4°C durante 10 dias, e foram avaliados quanto à perda de água, a textura e a retrogradação da amilopectina. Os produtos obtidos pela ação da xilanase e CGTase sobre as arabinoxilanas e o amido, respectivamente, isolados da farinha de trigo, foram analisados por HPAEC-PAD e HPLC. O fungo *T. aurantiacus* exibiu uma variação no perfil enzimático de acordo com cada substrato usado no seu cultivo. O substrato que resultou no melhor perfil enzimático para o uso em panificação foi o sabugo de milho, porque esse extrato enzimático exibiu alta atividade xilanolítica e baixa atividade amilolítica e proteolítica. A adição de xilanase, CGTase e xilanase/CGTase aumentou o volume da massa e o volume específico dos pães. Quanto ao estudo do envelhecimento, as enzimas adicionadas separadamente ou em conjunto reduziram a retrogradação da amilopectina e a firmeza do miolo durante o armazenamento em relação aos pães livres de enzima. Com relação à análise de firmeza do miolo houve um efeito sinérgico das enzimas estudadas. O extrato enzimático produzido pelo *T. aurantiacus* mostrou haver xilanases que quebram as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 da cadeia principal e também xilanases desramificadoras que liberam arabinose e glicose dos pontos de ramificação. O complexo xilanolítico mostrou ter afinidade pelas arabinoxilanas não extraída com água (WU-AX). Nas análises de suscetibilidade do amido frente à ação da CGTase observou-se claramente a realização de reações de acoplamento, desproporção e/ou uma atividade hidrolítica. A presença principalmente de  $\beta$ -ciclodextrina confirma que a CGTase estudada neste trabalho é uma  $\beta$ -CGTase. A presença de ciclodextrina no pão mostrou a preservação da atividade de ciclização da CGTase durante o processo de panificação.

**Palavras chave:** Pão, xilanase, ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), processo de envelhecimento.

## ABSTRACT

The development of bread technology is a phenomenon of great impact on food industry. For years, many additives were used on bread technology, increasing the bread quality and improving the acceptance of general population. The aim of this work was to study the effects on the bread quality and on the staling process, by adding enzymes to the dough. The enzymes used were xylanase from the fungus *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 in the concentrations 20, 35 and 50U/100 g wheat flour and/or cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from the bacteria *Bacillus clausii* E16 in the concentration 15 and 30U/100 g wheat flour, partially purified. The action mechanisms of these enzymes under the substrates arabinoxylan and starch, respectively, were also evaluated. The breads added of xylanase, CGTase and xylanase/CGTase were produced in three distinct stages. For bread staling study, the breads were stored at 4°C for 10 days, and they were analyzed regarding to the moisture content, texture and amylopectin retrogradation. The products obtained by the action of xylanase and CGTase on arabinoxylans and starch, respectively, isolated from wheat flour, were analyzed by using HPAEC-PAD and HPLC. The fungus *T. aurantiacus* exhibited a variation on the enzymatic profile according to each substrate used on its cultivation. The substrate which resulted in a better enzymatic profile for using on breadmaking was corncob, since this enzymatic extract exhibited high xylanolytic activity and low amylolytic and proteolytic activities. The addition of xylanase, CGTase and xylanase/CGTase increased the dough volume and the specific volume of the breads. Regarding to the staling study, the enzymes added separated or together reduced amylopectin retrogradation and firmness of the crumb during storage, when compared with breads without addition of enzymes. There was a synergistic effect of the enzymes regarding to the firmness of the crumb. The enzymatic extract produced by *T. aurantiacus* contained xylanase that cleaves on  $\beta$ -1,4 glycosyl linkages of main chain and also contained debranching xylanase which release arabinose and glucose from the branched points. The xylanolytic complex showed affinity for water unextracted arabinoxylans (WU-AX). From the starch susceptibility to CGTase action, was clearly observed coupling reactions, disproportionation and/or hydrolytic action. The presence of  $\beta$ -cyclodextrin confirms that the CGTase used in this study is a  $\beta$ -CGTase. The presence of cyclodextrin in the bread showed the preservation of cyclization activity of CGTase during the breadmaking process.

**Keywords:** Bread, xylanase, cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase), staling process.

CAPÍTULO I  
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>2</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>5</b>
1.2.1. ENVELHECIMENTO DO PÃO.....	5
1.2.2. COMPONENTES DA FARINHA DE TRIGO.....	10
1.2.2.1. <b>Amido .....</b>	<b>11</b>
1.2.2.2. <b>Proteínas .....</b>	<b>13</b>
1.2.2.3. <b>Carboidratos não amiláceos .....</b>	<b>14</b>
1.2.3. XILANA.....	15
1.2.3.1. <b>Enzimas xilanolíticas .....</b>	<b>18</b>
1.2.3.2. <b>Produção de xilanases termofílicas .....</b>	<b>22</b>
1.2.3.3. <b>Aplicação industrial das xilanases .....</b>	<b>24</b>
1.2.4. CICLODEXTRINA .....	25
1.2.4.1. <b>Ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) .....</b>	<b>27</b>
1.2.4.2. <b>Produção e aplicação industrial da ciclodextrina .....</b>	<b>28</b>
<b>1.3. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>31</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.	Modelo proposto para o envelhecimento do miolo do pão, mostrando a estrutura molecular da massa, pão fresco e pão envelhecido e pão reaquecido .....	7
Figura 1.2.	Modelo proposto para o envelhecimento do miolo do pão, mostrando as ligações entre o amido remanescente e o glúten .....	7
Figura 1.3.	Estrutura da molécula de amilose e da amilopectina .....	11
Figura 1.4.	Esquema representando a ação das enzimas amilolíticas e pululíticas (desramificadoras) .....	12
Figura 1.5.	Representação esquemática das gliadinas e gluteninas na rede glúten .....	14
Figura 1.6.	Representação esquemática da degradação enzimática da arabinoxilana (AX) e o efeito das diferentes frações de AX sobre o volume do pão .....	15
Figura 1.7.	Composição da O-acetil-4- O-metilglicuronoxilana (xilana de madeira dura) .....	16
Figura 1.8.	Composição da arabino-4- O-metilglicuronoxilana. (madeira macia) .....	17
Figura 1.9.	Elementos estruturais da arabinoxilana .....	17
Figura 1.10.	(A): Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana. (B): Hidrólise de xilooligossacarídeo pela -xilosidase .....	20
Figura 1.11.	Mecanismo de reação das xilanases .....	22
Figura 1.12.	Estrutura físico-química das $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ -CDs .....	26
Figura 1.13.	Reações catalisada pela CGTase. ....	27

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Classificação do trigo.....	10
---	----

## 1.1 Introdução

As xilanases são amplamente utilizadas como aditivo na indústria de panificação. O primeiro relato das xilanases na indústria de panificação foi na década de 70. As xilanases que são enzimas que hidrolisam os polissacarídeos não amiláceos, causam um efeito positivo sobre a massa e a qualidade do pão, causando uma maior flexibilidade, estabilidade e expansão da massa, bem como uma melhora na estrutura do miolo (MARTINEZ-ANAYA; JIMENEZ, 1997; COURTIN; DELCOUR, 2002; (COLLINS et al., 2006).

As arabinoxilanas são pentosanas da parede celular dos cereais, constituídas de moléculas de D-xiloses unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, que apresentam como grupo substituinte moléculas de L-arabinose ligadas ao carbono C-2 e/ou C-3 da xilose por ligação glicosídica  $\alpha$ -1,2 e/ou  $\alpha$ -1,3 (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999). O substituinte arabinose pode estar esterificado com grupos fenólicos como o ácido ferúlico e o ácido *p*-cumárico por meio de uma ligação éster (MÜLLER-HARVEY et al., 1986).

O fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* é um bom produtor de xilanase termoestável (DA-SILVA et al., 2005). A maioria dos estudos mostra a ação de xilanases mesofílicas sobre a melhoria da qualidade de pães (LAURIKAINEN et al., 1998; PRABHASANKAR et al., 2004; SHAH; SHAH; MADAMWAR, 2006) e pouco se encontra com relação a xilanases termofílicas. A vantagem do uso de xilanase termoestável consiste de sua ação continuada mesmo após a temperatura de gelatinização do amido. Recentemente foi estudado o uso de endoxilanase termofílica recombinante em diferentes concentrações na produção de pães (JIANG et al., 2005; COLLINS et al., 2006; JIANG; BAIL; WU, 2007). O emprego de enzima nativa tem a vantagem de não receber a rejeição que produtos recombinantes ainda despertam nos consumidores.

Outra enzima estudada para melhorar a qualidade de pães é a ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). Esta enzima é a única capaz de hidrolisar o amido em uma série de dextrinas cíclicas não-redutoras, via reação de ciclização, além da produção de dextrinas de baixo peso molecular (JEMLI et al., 2007).

As ciclodextrinas são capazes de formar complexos de encapsulação com substâncias voláteis (aromas) que permite a redução da volatilidade do aroma dos pães, aumentando o tempo de armazenamento e reduzindo as perdas, o que poderia afetar diretamente o processo de envelhecimento de pães (SZEJTLI, 1997).

Em panificação estudos recentes foram realizados para investigar o efeito da CGTase sobre o processo de envelhecimento de pães adicionados desta enzima. Como a CGTase age sobre o amido vários pesquisadores como Lee et al., (2002); Gujral; Haros; Rosell, (2003) atribuem o efeito antienvelhecimento desta enzima à hidrólise da amilose e da amilopectina em frações menores, limitando a retrogradação dessas moléculas durante o armazenamento.

A indústria de panificação tem focado a atenção no desenvolvimento de tecnologias para produção de pães com melhores características tecnológicas como volume, maciez, envelhecimento lento, maior valor nutricional e visando reduzir os custos de produção. Ao longo dos anos vários coadjuvantes foram incorporados à tecnologia de panificação, levando a um grau elevado na qualidade destes produtos e fazendo crescer a sua aceitação pela população em geral. Ao mesmo tempo, criou-se um segmento de consumidor disposto a pagar mais por um produto de elevada qualidade.

Neste contexto, muito tem sido feito no sentido de minimizar os efeitos negativos do processo de envelhecimento, visando diminuir as perdas causadas durante o armazenamento dos pães, mas os efeitos da xilanase termoestável e da CGTase na fabricação de pão é ainda não conclusivos, no que diz respeito ao melhoramento da qualidade da massa, ao processo de envelhecimento durante o armazenamento, e ao mecanismo de ação dessas enzimas.

Com certeza, a aplicação de enzimas na produção de pães de qualidade, constitui hoje o estado da arte neste segmento da indústria de alimentos.

## **1.2. Revisão de literatura**

### **1.2.1. Envelhecimento do pão**

O pão é definido como um produto perecível que resulta do cozimento de uma massa obtida pela mistura de farinha de trigo, sal comestível e água potável, fermentada por espécies de microrganismos próprios para a fermentação do pão. Outros ingredientes como gordura, enzimas exógenas, melhoradores, emulsificantes, leite e outros produtos lácteos, além de glúten também podem ser adicionados ([HOSENEY, 1991](#)).

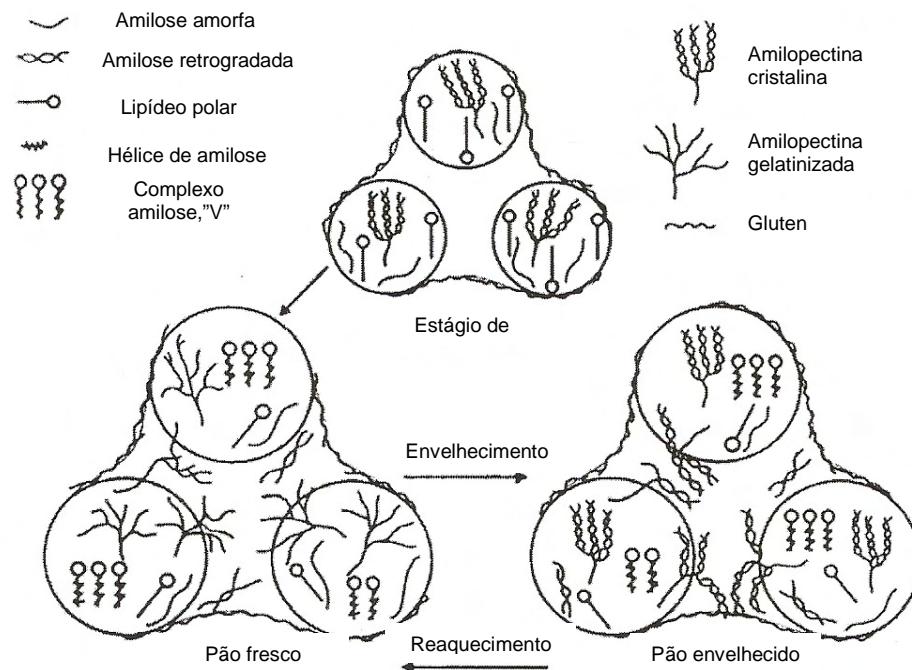
O processo de envelhecimento do pão inicia-se logo após o forneamento. A deteriorização do produto é facilmente reconhecida pelos consumidores, e está além da proliferação de microrganismos indesejáveis. Outras alterações estão relacionadas com o envelhecimento do pão, incluindo aumento da umidade da crosta (perda da crocância), cristalinidade do amido e firmeza do miolo; perda das propriedades organolépticas, do aroma do pão e da capacidade de hidratação do miolo ([HOSENEY, 1984](#); [GRAY](#); [BEMILLER, 2003](#); [RIBOTTA](#); [BAIL, 2007](#)). O desenvolvimento da firmeza do miolo está estritamente relacionado ao processo de envelhecimento do pão e no momento sua completa elucidação não foi alcançada

Por muitos anos, a teoria de que a retrogradação da amilopectina dentro dos grânulos de amido resultava na maior firmeza do miolo foi aceita como fato ([SCHOCH, FRENCH, 1947](#)). O termo retrogradação é usado para descrever as mudanças que ocorrem durante o resfriamento e armazenamento do amido gelatinizado. A retrogradação resulta da formação de

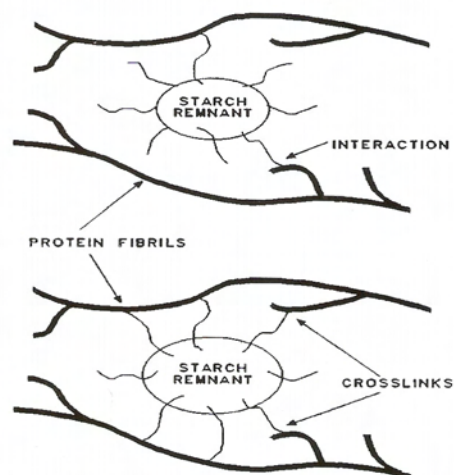
agregados cristalinos ou reassociação das moléculas de amilose e amilopectina com a liberação de água num fenômeno denominado de sinérese (THOMAS; ATWELL, 1999). No pão a retrogradação da amilose ocorre nas primeiras horas após o forneamento. A retrogradação da amilopectina ocorre a longo prazo e parece ser um dos principais fenômenos responsável pela firmeza do miolo durante o armazenamento (RIBOTTA; BAIL, 2007). Outros fatores, além do período de armazenamento, influenciam o comportamento de retrogradação da amilopectina como: temperatura de armazenamento, estrutura desse polissacarídeo e outros componentes presentes (ELIASSON, 1986).

Zobel e Kulp (1996) propuseram um modelo para o envelhecimento do pão, que enfatizava o papel do amido. Na massa, a amilopectina existe na sua forma cristalina dentro do grânulo. Durante o processo de panificação, mais especificamente durante a etapa de forneamento, a cristalinidade da amilopectina é perdida pela gelatinização do grânulo de amido. Com o intumescimento do grânulo de amido, as moléculas de amilopectina têm uma maior liberdade para expandir dentro do espaço intergranular. No pão fresco, as moléculas de amilose e algumas de amilopectina estão lixiviadas para o exterior do grânulo de amido e é neste momento que algumas amiloses formam complexos de inclusão com lipídios. Durante o envelhecimento do pão a amilopectina se reorganiza dentro de uma estrutura mais cristalina e esta reorganização (retrogradação) confere rigidez ao grânulo intumescido e ao material intergranular (**Figura 1.1**) (ZOBEL; KULP, 1996).

No entanto, vários autores concordam que o envelhecimento do pão não é função apenas da retrogradação da amilopectina (MALEKI, HOSENEY, MATTERN (1980); HE, HOSENEY (1990); MARTIN, ZELEZNAK, HOSENEY (1991); MARTIN, HOSENEY (1991). Maleki, Hoseney, Mattern (1980) sugerem que o envelhecimento do pão está relacionado com a qualidade das proteínas da farinha. Martin, Zeleznak, Hoseney (1991) propuseram um modelo de envelhecimento, onde a firmeza do miolo tem causas nas interações entre as moléculas de amilose e amilopectina dos grânulos de amido remanescentes da gelatinização (fase descontínua) e o glúten (fase contínua) devido à diminuição da capacidade de hidratação do miolo (desidratação). De acordo com esse modelo, grânulos de amido menos intumescidos teriam uma área exposta menor, portanto, menos ligações ou ligações mais fracas ocorreriam com o glúten (fibrila de proteína). Esses pesquisadores sugerem que essas ligações entre o amido e o glúten conferem a firmeza do miolo, e, portanto o envelhecimento do pão (**Figura 1.2**).



**Figura 1.1.** Modelo proposto para o envelhecimento do miolo do pão, mostrando a estrutura molecular da massa, pão fresco e pão envelhecido e pão reaquecido. (ZOBEL; KULP, 1996).



**Figura 1.2.** Modelo proposto para o envelhecimento do miolo do pão, mostrando as ligações entre o amido remanescente e o glúten (MARTIN, ZELEZNAK, HOSENEY, 1991).

É conhecido que a prevenção da perda de água do miolo para a crosta pode retardar o envelhecimento, portanto, o papel da água é importante no processo de envelhecimento do pão. O amido e o glúten têm diferentes capacidades de reter a água, e a migração de água tem sido investigada, mas as teorias ainda são controversas. Um grupo de pesquisadores sugere que a migração da água ocorre do glúten para o amido (WILLHOFT (1971); LEUNG, MAGNUSON, BRUINSMA (1983). Eles sugerem que o amido passe do estado amorfo para o

estado cristalino e que a água seria necessária para a cristalização do amido. A água é incorporada dentro da estrutura cristalina, tornando moléculas imóveis. Outro grupo de pesquisadores ([Cluskey, Taylor, Senti \(1959\)](#); [Senti, Dimler \(1969\)](#); [Gray; Bemiller \(2003\)](#)) sugerem que a migração da água ocorre do amido para o glúten. Eles sugerem que a capacidade de reter a água reduz com o envelhecimento devido a retrogradação á amilopectina, mas que no glúten não há alteração. Por essa razão eles concluíram que o amido expele água para o glúten.

O envelhecimento do pão tem sido estudado pela análise da retrogradação do amido usando o Calorímetro Diferencial de Varredura (*Differential Scanning Calorimeter* - DSC) que monitora a cristalização ou reorganização das moléculas de amilopectina durante o armazenamento do pão. O DSC informa a variação da entalpia de retrogradação ( $\Delta H_r$ ) necessária para fundir a amilopectina cristalizada ou reorganizada durante o armazenamento sendo o valor da entalpia proporcional á retrogradação ([THOMAS; ATWELL, 1999](#)).

Diversas pesquisas têm mostrado que as arabinoxilanas da farinha de trigo possuem uma capacidade significativa para afetar as propriedades da massa e do pão e que sua modificação pelas xilanases causa forte impacto na estrutura e funcionalidade das mesmas. Dependendo da concentração de xilanases e suas especificidades para os substratos WU-AX e WE-AX, essas enzimas exibem diferenças sobre a sua funcionalidade em panificação. É relatado que diversas xilanases apresentam um efeito antienvelhecimento sobre o pão convencional, detectado pelo *Calorímetro Diferencial de Varredura* (DSC) ([COURTIN; DELCOUR, 2002](#); [HAROS; ROSELL; BENEDITO, 2002](#); [GRAY; BEMILLER, 2003](#)).

[Rouau; El-Hayek; Moreau \(2001\)](#) sugeriram que o aumento dos níveis de arabinoxilanas (WE-AX), foi a provável causa para a melhora na qualidade dos pães após a adição de um preparado contendo endoxilanase. Esses autores sugeriram que a ação hidrolítica das xilanases quebrando as ligações glicosídicas, com conseqüente liberação de água e diminuição das arabinoxilanas (WU-AX), poderia explicar o efeito positivo nos pães frescos.

O mecanismo de ação das endoxilanases na massa e no pão ainda não está de todo esclarecido, provavelmente porque as arabinoxilanas da farinha variam entre os diferentes tipos de trigo, assim como, a especificidade da enzima para diferentes substratos ([COURTIN, DELCOUR, 2001](#)).

Existem várias hipóteses para explicar esse mecanismo: a) a degradação dos carboidratos não amiláceos como as arabinoxilanas, aumentaria sua capacidade de reter a água evitando ou diminuindo a desidratação do pão. No entanto, a simples adição de água na massa não tem o mesmo efeito positivo exercido pelas xilanases; b) as arabinoxilanas (WU-AX) teriam um efeito negativo sobre as propriedades de retenção de gás. A ação das xilanases tornaria as arabinoxilanas insolúveis em solúveis, melhorando a formação da rede de glúten e assim, melhorando a retenção de gás pela massa; c) a parede celular retarda a acessibilidade

da água ao endosperma, em particular as proteínas do glúten. A enzima desestabilizaria a parede celular melhorando a acessibilidade da água às proteínas que absorveriam água, e posteriormente interagiriam umas com as outras por meio de pontes de hidrogênio e pontes de dissulfeto, formando uma rede (glúten) que aprisionaria o gás liberado durante a fermentação (SLUIMER, 2005).

Outra enzima estudada para melhorar a qualidade de pães é a ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). Esta enzima é a única capaz de hidrolisar o amido em uma série de dextrinas cíclicas não-redutoras, via reação de ciclização, além da produção de dextrinas de baixo peso molecular e oligossacarídeos (JEMLI et al., 2007).

Há trabalhos que relatam a ação catalítica de várias CGTases comerciais ou não sobre o amido da farinha de trigo com a produção de ciclodextrinas no miolo do pão, detectadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography - HPLC*), confirmando que há condições favoráveis no processo de panificação para a realização da reação de ciclização (LEE et al., 2002; GUJRAL et al., 2003; SHIM et al., 2007; JEMLI et al., 2007).

A aplicação de CGTase comercial no pão de farinha de arroz reduziu em 53% a firmeza do miolo do pão. Segundo Gujral et al. (2003) esse efeito antienvelhecimento é explicado em função do aumento da formação de maltooligossacarídeos higroscópicos pela ação da CGTase.

Os agentes aromatizantes ou *flavorizantes* são geralmente substâncias voláteis, normalmente hidrofóbicas e facilmente degradadas quando não protegidas. Os complexos de encapsulação formados permitem a redução da volatilidade do aroma dos pães, aumentando o tempo de armazenamento e reduzindo as perdas, o que poderia afetar diretamente o processo de envelhecimento de pães (SZEJTLI, 1997).

Recentemente, estudos foram realizados para investigar o efeito da CGTase sobre o processo de envelhecimento de pães adicionados desta enzima. Segundo Jemli et al. (2007); Shim et al. (2007), trabalhando com CGTases isoladas de *Paenibacillus pabuli* US132 e *Saccharomyces cerevisiae* mutante, respectivamente, observaram que a CGTase apresentou um efeito antienvelhecimento pela redução da firmeza dos pães durante o armazenamento. Estes autores atribuem este efeito antienvelhecimento a uma hidrólise da amilose e amilopectina em frações menores, limitando a retrogradação dessas moléculas durante o armazenamento.

As ciclodextrinas liberadas pela ação da CGTase podem formar complexos com lipídios nativos do grânulo de amido ou lipídios exógenos, diminuindo assim a retrogradação da amilose. Alternativamente, as dextrinas de baixo peso produzidas pela CGTase diminuem a taxa de retrogradação do pão pelo impedimento da interação amido-glúten interferindo no envelhecimento do pão (BOYLE; HEBEDA, 1990; MARTIN; HOSENEY, 1991).

Lee et al. (2002); Shim et al. (2007) também estudaram o envelhecimento de pães adicionados de CGTases isoladas de *Bacillus stearothermophilus* ET1 e *Saccharomyces cerevisiae* ambos mutantes, respectivamente. A variação da entalpia de retrogradação ( $\Delta H_r$ ) detectada pelo DSC dos pães adicionados de CGTase foi menor após sete dias de armazenamento a uma temperatura de 4°C.

Há vários trabalhos sobre a aplicação de enzimas em pães, que avaliam o retardo do envelhecimento. Esses pesquisadores observaram um efeito positivo na qualidade dos pães e na redução da firmeza do miolo durante o armazenamento. No entanto, as causas desses efeitos positivos não são conhecidas e na grande maioria dos trabalhos, nem são investigados. Este trabalho propõe avaliar os efeitos das enzimas xilanase e CGTase na produção de pães e investigar as possíveis causas para os resultados encontrados.

### 1.2.2. Componentes da farinha de trigo

O grão de trigo é constituído de três partes principais: o germe, o endosperma e as camadas externas protetoras. O germe é o tecido responsável pelo crescimento de uma nova planta e representa 3% do peso do grão. O endosperma é usado como gênero alimentício e representa 85% do peso do grão e as camadas protetoras denominadas de camada de aleurona e farelo são responsáveis pela proteção do grão e representam 12% do peso do grão. Em termos gerais a composição química do grão de trigo é de 14% umidade, 12% de proteína, 60% de amido, 10% carboidratos não amiláceos, 2% lipídios, 2% minerais (GOESAERT et al., 2005).

A classificação do trigo é necessária para fins de padronização. A Portaria nº 91, de 25 de fevereiro de 2010, do Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária (MAPA), determina como requisitos de qualidade do trigo, a força do glúten, a estabilidade, o peso hectolitro, o número de queda.

O trigo, de acordo com a força do glúten ou a estabilidade será classificado nas classes determinadas na **Tabela 1.1.**

**Tabela 1.1.** Classificação do trigo

Classes	Valor mínimo da força do glúten (10 <sup>-4</sup> J)	Valor mínimo de Estabilidade (Tempo em minutos)
Trigo Melhorador	300	15,0
Trigo Pão	220	10,0
Trigo para uso doméstico	180	7,0
Trigo Padrão	160	5,0
Trigo para outros usos	Abaixo de 160	Abaixo de 5,0

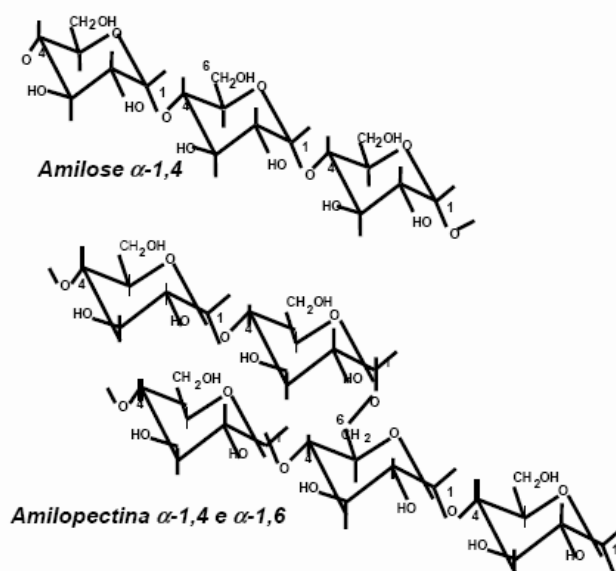
Fonte: Ministério MAPA

No Brasil, 75% do trigo são consumidos para a produção de farinha e o restante (25%) para farelo. Da farinha produzida, 50% é destinada ao setor de panificação, 15% para massas alimentícias, 15% para biscoitos, 10% para pães industrializados e 10% para produtos domésticos ([Federação das Indústrias do Estado do Paraná – FIEP, 2006](#)).

### 1.2.2.1. Amido

O amido é o composto mais abundante na farinha de trigo e o mais importante polissacarídeo de reserva de muitas plantas, incluindo os cereais. O grão do trigo contém 60% de amido, que se apresenta na forma de grânulos semi-cristalinos, localizados no endosperma ([GOESAERT et al., 2005](#)).

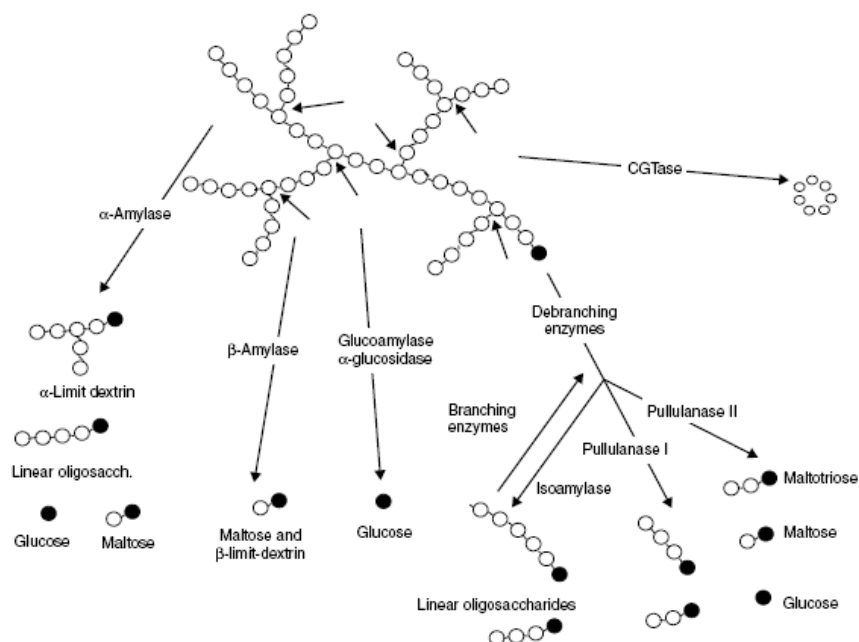
É um homopolissacarídeo neutro formado por duas frações: amilose e amilopectina. A primeira é composta de unidades de glicose ligadas entre si por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 formando assim unidades de maltose e, a segunda, por unidades de glicose unidas em  $\alpha$ -1,4 com cadeias de glicose ligadas em  $\alpha$ -1,6 de modo que, além de unidades de maltose, tem-se em menor proporção isomaltose nos pontos de ramificação. Enquanto a amilose é uma molécula essencialmente linear, apresentando um pequeno número de ramificações ([FRENCH, 1973](#); [HIZUKURI](#); [TAKEDA](#); [YASUDA, 1981](#); [BULÉON et al., 1998](#)), a amilopectina é uma molécula altamente ramificada, apresentando 5 a 6% de ligações  $\alpha$ -1,6 nos pontos de ramificação ([FRENCH, 1984](#); [LINEBACK, 1984](#)) (**Figura 1.3**).



**Figura 1.3.** Estrutura da molécula de amilose e da amilopectina (Adaptado de WONG, 1989).

Os grânulos de amido são estruturas semicristalinas formadas pelo arranjo na direção radial das macromoléculas lineares (amilose) e ramificadas (amilopectina). Essas moléculas formam pontes de hidrogênio, pois estão associadas paralelamente, o que resulta no

aparecimento de regiões cristalinas ou micelares. Assim, os grânulos são birrefringentes mostrando uma cruz de polarização (Cruz de Malta) se observados sob luz polarizada (FRANCO et al., 2001).



**Figura 1.4.** Esquema representando a ação das enzimas amilolíticas e pululíticas (desramificadoras). Os círculos representam os monômeros de glicose, os preenchidos indicam os monômeros com carbono anomérico livre (redutores) (Adaptado de BERTOLDO; ANTRANIKIAN, 2002).

A localização das enzimas no grão de trigo não é uniforme. Muitas enzimas são encontradas nas camadas externas (farelo), e no germe. Isto significa que durante a moagem do grão as enzimas são distribuídas desigualmente. O endosperma geralmente tem uma menor atividade enzimática (POUTANEN, 1997).

A degradação total do grânulo de amido ocorre por uma ação combinada de várias enzimas amilolíticas que clivam as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 da molécula de amilose e da amilopectina (**Figura 1.4**). Na farinha de trigo existem duas enzimas naturais que são a  $\alpha$ -amilase e a  $\beta$ -amilase. Normalmente, há uma variação da quantidade de  $\alpha$ -amilase presente no trigo e na farinha em função das condições do plantio, enquanto que a quantidade de  $\beta$ -amilase, praticamente não se altera (POUTANEN, 1997).

Em panificação o amido começa a exercer seu papel nas temperaturas entre 54°C e 63°C. Nessa faixa de temperatura os grânulos de amido gelatinizam e como resultado, o grânulo perde sua cristalinidade, tornando-se amorfo. Nesta fase a estrutura do grânulo é rompida e as moléculas, principalmente a amilose, é lixiviada para fora do grânulo, entretanto, no miolo do pão os grânulos de amido remanescentes ainda estão presentes, e a estrutura em

rede da gelatinização das moléculas de amido tem um papel vital na sua formação (SLUIMER, 2005).

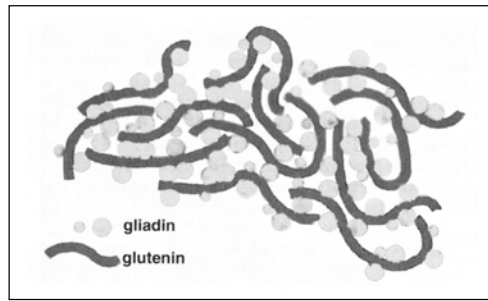
O amido também exerce um papel dominante no processo de envelhecimento do pão. Durante o resfriamento do pão, após o forneamento, as moléculas de amido começam a se agregar formando regiões mais cristalinas que resultam na firmeza inicial do pão. A firmeza do miolo durante o armazenamento é atribuída à agregação das moléculas de amilopectina e em menor grau das moléculas de amilose (SLUIMER, 2005).

#### 1.2.2.2. Proteínas

As proteínas também são moléculas importantes na farinha de trigo, Osborne (1924) citado por Goesert et al. (2005) introduziu uma classificação das proteínas de plantas baseada na solubilidade usando os seguintes solventes para extração: (1) água, (2) solução salina diluída, (3) solução água-álcool e (4) solução ácida ou básica diluída. Usando este esquema de classificação, Osborne classificou as proteínas do trigo em albuminas, globulinas, gliadinas e gluteninas, respectivamente.

Do ponto de vista funcional as proteínas do trigo classificam-se em dois grupos: as proteínas do glúten (gliadina e glutenina) que apresentam um papel fundamental em panificação e as proteínas “não glúten” ou “proteínas solúveis” que são aquelas que não fazem parte da formação da rede de glúten durante a mistura da farinha de trigo com água. As proteínas “não glúten” representam cerca de 20% das proteínas totais e estão localizadas principalmente nas camadas externas do grão, com baixa concentração no endosperma e tem como função serem proteínas estruturais (constituente de membranas). As proteínas do glúten, gliadina e glutenina, são usualmente encontradas na mesma proporção no endosperma dos grãos maduros onde elas formam uma matriz contínua ao redor do grânulo de amido (GOESAERT et al., 2005).

As gliadinas e gluteninas são denominadas proteínas do glúten por formarem uma rede capaz de reter o gás carbônico responsável pelo crescimento da massa e do pão. O desenvolvimento do glúten começa com o processo de mistura, onde as proteínas são umedecidas e tornam-se inchadas (absorvem água). Posteriormente, com a contínua mistura, essas moléculas interagem umas com as outras através de pontes de hidrogênio (grupos OH) e pontes dissulfeto (grupos SH) intra e intermolecular formando a rede de glúten. A presença de grupos tiol (SH) na estrutura protéica é de extrema importância para o desenvolvimento do glúten (SLUIMER, 2005) (Figura 1.5).



**Figura 1.5.** Representação esquemática das gliadinas e gluteninas na rede glúten (SLUIMER, 2005).

### 1.2.2.3. Carboidratos não amiláceos

Os carboidratos não amiláceos do grão de trigo são representados pela celulose, lignina e hemicelulose, principalmente as arabinoxilanas. Estudos sobre a histologia do grão de trigo realizados por [Pomeranz \(1988\)](#) mostraram que a concentração das arabinoxilanas não é uniforme e que a maior concentração ocorre na parede celular das camadas externas do grão (farelo) e uma menor quantidade no endosperma.

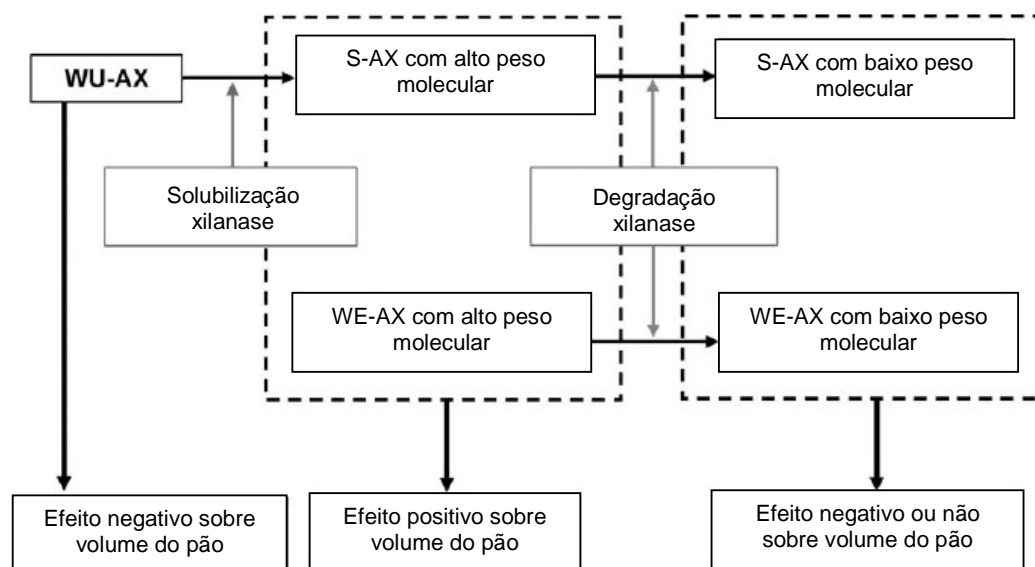
A concentração de arabinoxilanas (AX) na farinha de trigo varia entre 1,5-2,5%, sendo que 0,4-0,8% são de arabinoxilanas extraída com água (WE-AX) e 1,1-1,9% são de arabinoxilanas não extraídas com água (WU-AX) ([COURTIN; DELCOUR, 2002](#)). Embora as arabinoxilanas sejam consideradas constituintes menores da farinha de trigo, são importantes para a funcionalidade dos cereais nos processos biotecnológicos. As arabinoxilanas (WE-AX) apresentam um impacto significativo sobre as propriedades do pão, como volume, textura do miolo e taxa de envelhecimento ([HOSENEY, 1984](#)).

As xilanases são comumente usadas para melhorar o manuseio e/ou a qualidade dos produtos a base de cereais pela degradação e/ou a modificação das arabinoxilanas nativas ([SORENSEN et al., 2004](#)).

O impacto das endoxilanases sobre a funcionalidade das arabinoxilanas em panificação depende fortemente da sua especificidade pelos substratos WE-AX e/ou WU-AX ([COURTIN; GELDERS; DELCOUR, 2001](#)).

Do ponto de vista da funcionalidade mencionada acima pelos substratos, pode-se entender facilmente que o uso otimizado de endoxilanases que preferencialmente atacam o substrato WU-AX, causa um impacto positivo sobre as propriedades da massa e volume do pão como apresentado na **Figura 1.6**. Isto se deve pela redução das WU-AX e consequentemente o aumento das WE-AX ([COURTIN; ROELANTS; DELCOUR, 1999](#); [COURTIN; GELDERS; DELCOUR, 2001](#)).

Apesar dos trabalhos mostrarem que as endoxilanasases causam uma significativa melhora nas características da massa e do pão, o modo de ação exato dessas enzimas ainda está em debate e há vários pontos a serem esclarecidos.



**Figura 1.6.** Representação esquemática da degradação enzimática da arabinoxilana (AX) e o efeito das diferentes frações de AX sobre o volume do pão (COURTIN; ROELANTS; DELCOUR,1999).

### 1.2.3. Xilana

As hemiceluloses as quais incluem as arabinoxilana, xiloglucana,  $\beta$ -glucana e celulose são os principais polissacarídeos da parede celular do trigo e de outros cereais (REVANAPPA; SALIMATH, 2010).

Schulze (1891), citado por Bastawde (1992) introduziu o nome hemicelulose para os materiais vegetais isolados ou extraídos com soluções alcalinas. A classificação das frações da hemicelulose depende do tipo de açúcar presente na molécula. Os principais monômeros presentes na hemicelulose são a D-xilose, D-manose, D-galactose e L-arabinose.

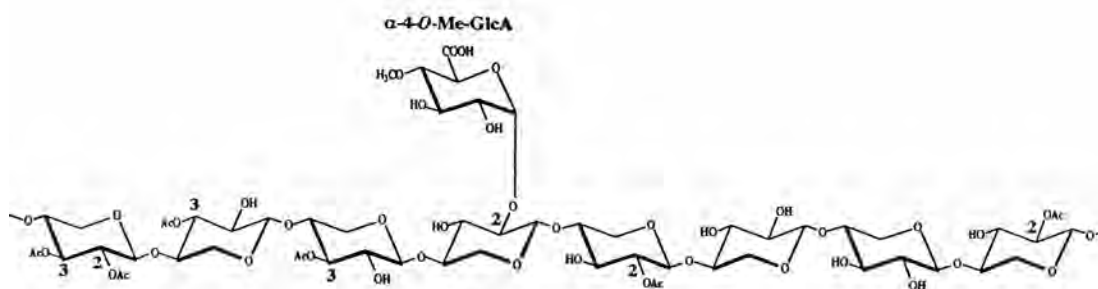
As principais fontes de hemicelulose são as culturas de cana-de-açúcar, sorgo, as culturas ricas em amido como os cereais (milho, trigo), os tubérculos (batata doce e mandioca) e os resíduos florestais (madeira) (MAGEE; KOSARIC, 1985).

A hemicelulose juntamente com a celulose e a lignina constitui os principais componentes poliméricos da parede celular das plantas, interagindo entre si via ligações covalentes e não-covalentes (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999; BEG et al., 2001).

A xilana é o principal heteropolissacarídeo com função estrutural da parede celular da célula vegetal, e o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, totalizando 1/3 de toda a fonte de carbono renovável da Terra (PRADE, 1995).

A estrutura da xilana é complexa e altamente ramificada. O grau de substituição e a natureza dos substituintes da cadeia lateral dependem da fonte e da espécie a partir da qual a xilana foi isolada. A cadeia principal é formada por unidades de D-xilopiranosil unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, podendo ser substituída em vários graus por glicuronopiranosil, 4-O-metil-D-ácido glicurônico,  $\beta$ -L-arabinofuranosil (arabinoxilanas), acetil, ácido ferúlico e/ou *p*-cumárico como grupo lateral (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999; LI et al., 2000).

Segundo Timell (1964), na madeira dura a xilana existe como O-acetil-4-O-metilglicuronoxilana (Figura 1.7). Este polissacarídeo apresenta no mínimo 70 resíduos de  $\beta$ -xilopiranosose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. De acordo com Bouveng (1961), a acetilação dessas xilanas ocorre mais freqüentemente na posição C-3 do que na C-2 da molécula de xilose, mas a acetilação em ambas as posições já foram relatadas. A presença dos grupos acetil é responsável pela solubilidade parcial da xilana em água.



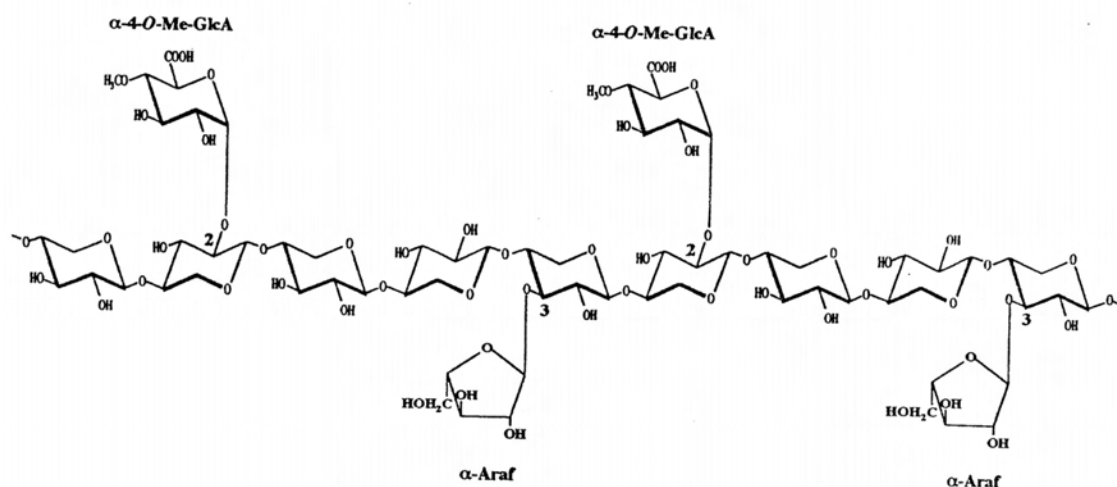
**Figura 1.7.** Composição da O-acetil-4-O-metilglicuronoxilana (xilana de madeira dura) (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

Xilanas de madeira macia não são acetiladas e, portanto, são compostas por arabino-4-O-metilglicuronoxilana. Os resíduos de ácidos 4-O-metilglicurônico estão localizados na posição C-2 nos resíduos de xilose, enquanto, os resíduos de  $\beta$ -L-arabinofuranose estão unidos por meio de ligações glicosídicas  $\beta$ -1,3 na posição C-3 da molécula de xilose (Figura 1.8). As xilanas de madeira por apresentarem como grupo lateral o ácido glicurônico são conhecidas como glicuronoxilanas (PULS; SCHUSEIL, 1993).

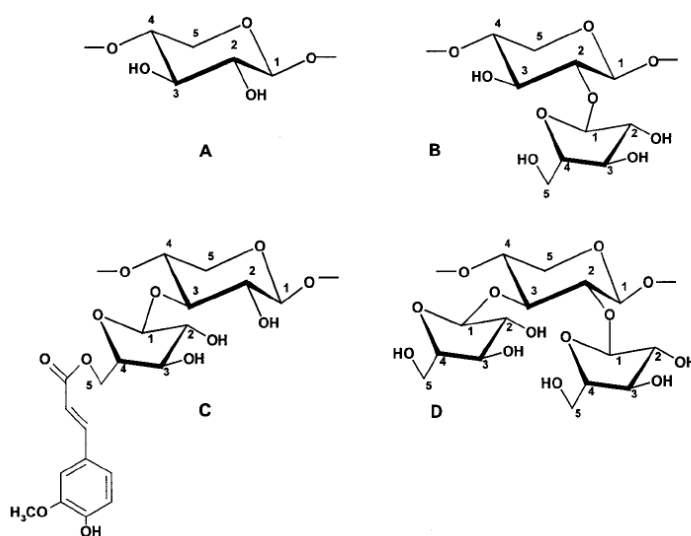
Segundo Kulkarni; Shendye; Rao (1999) o grau de polimerização e a quantidade de ramificações também variam. Xilanas de madeiras duras apresentam um maior grau de polimerização (150-200 resíduos de  $\beta$ -xilopiranosose) e são mais ramificadas do que as xilanas de madeiras macias (70-130 resíduos de  $\beta$ -xilopiranosose).

Nos cereais as xilanas são tipicamente conhecidas como arabinoxilanas (arabinose/xilose - AX) que são xilanas que apresentam como grupo substituinte moléculas de L-arabinose ligadas ao carbono C-2 e/ou C-3 da xilose através de uma ligação glicosídica  $\alpha$ -1,2 e/ou  $\alpha$ -1,3 (Figura 1.9). Arabinoxilanas de cereais, também conhecidas como pentosanas, são mais solúveis em água e em solução alcalina do que as xilanas de materiais lignocelulósicos

devido a sua estrutura ramificada (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999). Em xilanas de cereais, o substituinte arabinose pode ser esterificado com grupos fenólicos como o ácido ferúlico e o ácido *p*-cumárico (MÜLLER-HARVEY et al.,1986).



**Figura 1.8.** Composição da arabino-4- O-metilglucuronoxilana. (madeira macia) (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).



**Figura 1.9.** Elementos estruturais da arabinoxilana. (A): resíduo de D-xilopirranose; (B) e (D): resíduo de D-xilopirranose substituído com resíduos de L-arabinose ligadas no C-2 e C-2 e C-3, respectivamente; (C): resíduo de arabinoxilana com substituinte L-arabinose esterificado com ácido ferúlico por meio de ligação éster (COURTIN; DELCOUR, 2002).

Barry; Dillon (1940); Nunn; Parolis; Russel (1973); Eda; Ohnishi; Kato (1976), citados por Collins; Gerday; Feller (2005) em um artigo de revisão, afirmam que a xilana de cadeia linear, ou seja, sem grupos substituintes são encontradas em tabaco e em certas algas marinhas, onde os resíduos de xilopirranose são unidos por ligações -1,3 e -1,4

As arabinoxilanas presentes nos cereais estão localizadas na parede celular do farelo e do endosperma e na matriz que mantém as células unidas no grão. Segundo Courtin; Delcour

(2002) elas podem ser divididas em arabinoxilanas extraídas ou solúveis em água (*water-extractable arabinoxylan* - WE-AX) e arabinoxilanas não extraídas ou insolúveis em água (*water-unextractable arabinoxylan* - WU-AX).

A formação de pontes de hidrogênio entre as arabinoxilanas e a água, é influenciada pela presença de arabinose nas cadeias ramificadas. A arabinose unida por ligações glicosídicas nas posições C-2 e/ou C-3 do monômero de xilose, tornam as arabinoxilanas mais hidrossolúveis. O grau de ramificação das arabinoxilanas pode influenciar a atuação das enzimas devido a um impedimento estérico (ROUBROEKS et al., 2001).

Os açúcares que compõem as arabinoxilanas extraídas com em água (WE-AX) são xilose e arabinose, enquanto, as arabinoxilanas não extraídas com água (WU-AX) são compostas pela xilose, arabinose e glicose. Há diferenças entre essas duas moléculas no que se refere ao grau de ramificação, de polimerização e ao peso molecular, sendo que nas arabinoxilanas insolúveis (WU-AX) essas características são sempre superiores (ELIASSON; LARSSON, 2007).

Segundo Courtin; Delcour (2002) cerca de 30% das arabinoxilanas encontradas na parede celular do endosperma da farinha de trigo são extraídas com água (WE-AX), devido a estas moléculas estarem superficialmente ligadas na parede celular. Ao contrário, as arabinoxilanas não extraídas com água (WU-AX), não são isoladas facilmente da parede celular devido às interações covalentes e não-covalentes com outras moléculas de xilanas ou interações com outros constituintes como proteínas, lignina ou celulose (LIYAMA; LAM; STONE, 1994).

Quando as arabinoxilanas não extraídas com água (WU-AX) são tratadas com solução alcalina, as ligações que estabilizam as moléculas de arabinoxilanas são rompidas. A maior parte das arabinoxilanas WU-AX fica livre na matriz da parede celular e assim pode ser isolada pela água. Essas arabinoxilanas são conhecidas como arabinoxilanas solúveis em soluções alcalinas (*alkali-solubilised arabinoxylan* – AS-AX) (GRUPPEN; HAMER; VORAGEN, 1992).

Outra maneira de isolar as arabinoxilanas não extraídas com água (WU-AX) é hidrolisá-las em moléculas menores pelo uso de enzimas xilanolíticas que degradam as ligações glicosídicas da cadeia principal. A hidrólise enzimática libera os carbonos C-1 e C-4 (hidrogenando-os) envolvidos nas ligações glicosídicas, tornando as arabinoxilanas solúveis em água. Essas arabinoxilanas são conhecidas como arabinoxilanas solubilizadas enzimaticamente (*enzyme-solubilised arabinoxylan* – ES-AX) (COURTIN; DELCOUR, 2001).

### 1.2.3.1. Enzimas xilanolíticas

Xilanases (EC 3.2.1.8) são enzimas hidrolíticas que quebram as ligações glicosídicas da cadeia principal e das cadeias laterais do polissacarídeo xilana presente na parede celular das

células vegetais. Existem várias dessas enzimas, as quais exibem diversas particularidades, como: mecanismo de ação, especificidade por substratos, atividades hidrolíticas (produção, velocidade de reação e produtos formados) e características físico-químicas (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

A maioria das enzimas xilanolíticas é sintetizada por bactérias e fungos, mas também podem ser encontradas em plantas, algas marinhas, protozoários, gastrópodes e artrópodes (DEKKER; RICHARDS 1976; PRADE, 1995).

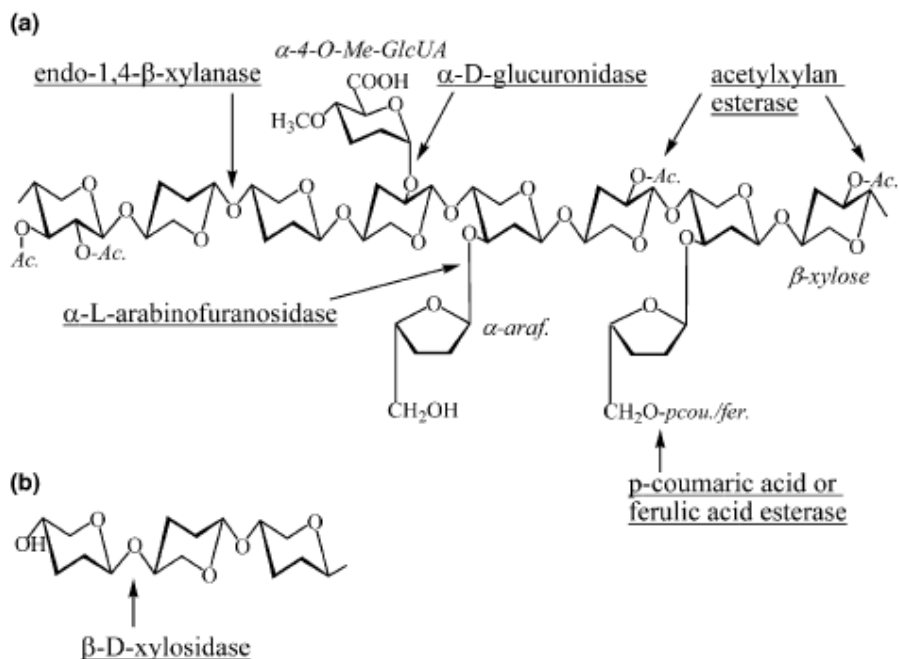
O primeiro relato dessas enzimas foi em 1955, quando elas foram originalmente denominadas de pentosanases e foram reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology* – IUBMB). Em 1961 as xilanases foram reconhecidas pelo Comitê de Enzima e identificadas pelo número de classificação (EC) (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

Wong; Tan; Saddler (1988) classificaram as xilanases microbianas em dois grupos, baseando-se em suas propriedades físico-químicas, como massa molecular e ponto isoelétrico, mais do que em suas diferenças nas propriedades catalíticas. O primeiro grupo consiste de enzimas com massa molecular maior que 40 kDa e baixos valores de ponto isoelétrico (predominância de aminoácidos ácidos), enquanto que o segundo grupo é formado por enzimas com massa molecular menor que 40 kDa e altos valores de ponto isoelétrico (predominância de aminoácidos básicos), mas exceções existem.

De acordo com Subramaniyan; Prema (2002) a heterogeneidade e a complexidade da xilana, requer um amplo complexo de enzimas atuando cooperativamente para hidrolisar este heteropolissacarídeo (Figura 1.10).

Dekker; Richards (1976); Wong; Tan; Saddler (1988) observaram que as -1,4-D-endoxilanases (EC 3.2.1.8) quebram internamente as ligações glicosídicas -1,4 da cadeia principal da xilana, resultando em produtos com menor grau de polimerização como os xilooligossacarídeos, os quais podem ser hidrolisados a moléculas menores como xilotriose, xilobiose e xilose. Deste modo, a ação desta enzima afeta drasticamente a massa molecular e a solubilidade das arabinoxilanas e consequentemente sua funcionalidade. Para Sunna; Antranikian (1997), o ataque da enzima não é aleatório e a hidrólise das ligações glicosídicas depende da natureza do substrato como comprimento da cadeia e grau de ramificação. Segundo Dekker; Richards (1976), algumas -1,4-D-endoxilanases podem liberar como produto a arabinose e serem chamadas de enzimas desramificadoras.

O fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* produz quantidades significativas de endoxilanases termoestáveis quando cultivado sobre fermentação sólida usando farelo de trigo como fonte de carbono. Duas endoxilanases foram purificadas e caracterizadas a partir deste fungo (KALOGERIS et al., 1998).



**Figura 1.10.** (A): Enzimas xilanólíticas envolvidas na degradação da xilana. (B): Hidrólise de xilooligossacarídeo pela  $\beta$ -xilosidase (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

As  $\beta$ -1,4-D-xilosidases (EC 3.2.1.37) são exoenzimas que hidrolisam preferencialmente xilooligossacarídeos e xilobiose a partir da extremidade não redutora da molécula para liberação de xilose como produto final (WONG; TAN; SADDLER, 1988).

Estudos têm mostrado que a incubação da  $\beta$ -xilosidase de *Aspergillus awamori* não é capaz de liberar quantidades significativas de xilose a partir da xilana, mas quando incubada com xilobiose, xilotriose e xilotetose é acompanhado pela formação de xilose como produto principal (KORMELINK et al., 1992).

Apesar da importância do papel das arabinosidases ou arabinofuranosidase na hidrólise da xilana, apenas poucas enzimas têm sido isoladas e caracterizadas. Existem dois tipos de arabinosidases, as exoenzimas  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), a qual é ativa sobre os grupos L-arabinofuranosil nos pontos de ramificação da xilana que são unidas aos resíduos de xilose por ligações  $\alpha$ -1,2 e/ou  $\alpha$ -1,3. O segundo grupo são as endoenzimas 1,5-  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.99), que hidrolisam os resíduos de L-arabinofuranosil unidos entre si por ligações  $\alpha$ -1,5. Esta estrutura incomum da arabinoxilana é encontrada em sementes de agrião (VAN DER VEEN et al., 1992).

Outra enzima do sistema xilanolítico é a  $\alpha$ -D-glicuronidase (EC 3.2.1.-) que hidrolisa as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,2 entre o ácido glicurônico e os resíduos de xilose das glicuronoxilanas. Apesar do papel importante das  $\alpha$ -glicuronidases na biodegradação da xilana, poucas enzimas têm sido relatadas até agora (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

A especificidade da  $\beta$ -glicuronidase ao substrato varia de acordo com a fonte enzimática, por exemplo, enzimas isoladas de *Agaricus bisporus* e *Streptomyces olivochromogenes* requerem o substrato glicuronoxilana de baixo peso molecular. Estas enzimas liberam ácido 4-O-metilglicurônico a partir do substituinte 4-O-metilglicuronose de xilooligossacarídeos, mas não a partir da xilana. Entretanto, a presença de grupos acetil próximos aos grupos substituintes retarda a ação da  $\beta$ -glicuronidase produzida pelo *Agaricus bisporus* (PULS; SCHMIDT; GRAZOW, 1987; JOHNSON et al, 1989).

Acetilxilana esterase (EC 3.1.1.6) remove os substituintes O-acetil da posição C-2 e C-3 dos resíduos de xilose nas xilanas acetiladas (acetilxilanas) (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

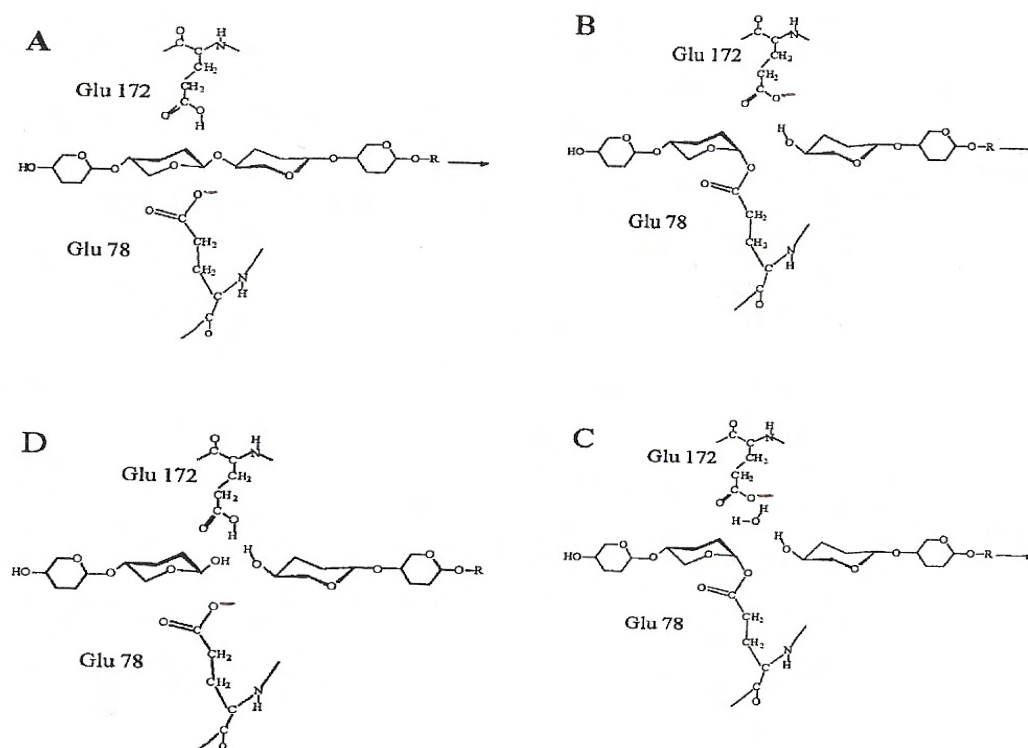
Biely; Puls; Schneider (1985) foram os primeiros a relataram a presença da acetilxilana esterase em microrganismos. Segundo Tenkanen; Poutanen (1992), a principal razão para a descoberta tardia desta enzima foi a falta de substrato adequado, já que as xilanas altamente acetiladas no seu estado natural perdiam os grupos acetil devido ao isolamento da xilana com soluções alcalinas. A atividade da acetilxilana esterase foi relatada como sendo parte do sistema xilanolítico de *Trichoderma reesei* e *Schizophyllum commune* (BIELY; PULS; SCHNEIDER, 1985).

Os primeiros pesquisadores a relataram as enzimas desramificadoras ácido ferúlico esterase (EC 3.1.1.-) e ácido *p*-cumárico esterase (EC 3.1.1.-) foram Mackenzie e Bilous, (1988). A enzima ácido ferúlico esterase hidrolisa as ligações ésteres entre os substituintes arabinose e ácido ferúlico na xilana. Similarmente a enzima ácido *p*-cumárico esterase hidrolisa as ligações ésteres entre a arabinose e o ácido *p*-cumárico na mesma molécula (MÜLLER-HARVEY et al., 1986; MACKENZIE; BILOUS, 1988).

As xilanases originadas de fungos são classificadas em dois grupos: as xilanases desramificadoras que liberam arabinoses localizadas nas cadeias laterais das arabinoxilanas (**Figura 1.10**) e as xilanases não desramificadoras, as quais não liberam arabinose durante a catálise enzimática. (REILY, 1981). Muitas xilanases originadas de fungos como *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger* e *Streptomyces roseiscleroticus* liberam arabinose do polissacarídeo arabinoxilana durante a catálise enzimática (TAKENISHI; TSUJISAKA, 1973; MISHRA; KESKAR; RAO, 1984). Entretanto, xilanases originadas de *Trichoderma harzianum* e outros fungos do grupo *A. niger* não liberam arabinose livre a partir das arabinoxilanas (WONG et al., 1986). Geralmente, arabinoxilanas altamente ramificadas interferem na atividade da xilanase, mas essas enzimas apresentam uma maior afinidade pelas ligações da cadeia principal, perto dos pontos de ramificação. A especificidade das xilanases pelos substratos pode ser devido às diferenças entre os resíduos de aminoácidos envolvidos no sítio catalítico (DEKKER; RICHARDS, 1976).

O mecanismo enzimático proposto para a hidrólise das arabinoxilanas pela xilanase ocorre pelo processo catalítico ácido-base. O glutamato Glu<sup>172</sup> é o catalisador ácido-base e o

Glu<sup>78</sup> é o nucleófilo. A ligação glicosídica é quebrada pelo ataque nucleófilo do Glu<sup>78</sup> do sítio ativo da enzima. O carbono 4 (C-4) permanece com o oxigênio que estava envolvido na ligação glicosídica e é estabilizado pela transferência de um próton do Glu 172, enquanto o carbono 1 (C-1) forma um intermediário com o Glu<sup>78</sup>. Na etapa seguinte da catálise o nucleófilo Glu<sup>78</sup> é deslocado pela água (hidrólise) com a formação de uma hidroxila no carbono glicosil (C-1) e o outro hidrogênio da molécula de água é transferido para o Glu 172. Todas as xilanases mantêm a configuração anomérica do oxigênio glicosídico (C-1), isto indica que estas enzimas usam um mecanismo de duplo deslocamento (MIAO et al., 1994; DAVIES, HENRISSAT, 1995) (Figura 1.11).



**Figura 1.11.** Mecanismo de reação das xilanases. A: estrutura em hélice da xilana é posicionada no sítio ativo da enzima entre o Glu<sup>172</sup> (catalisador ácido-base) e o Glu<sup>78</sup> (nucleófilo); B: A glicona (xilobiose) é ligada no Glu<sup>78</sup>. Este intermediário permanece no sítio ativo da enzima durante a reação de transglicosilação; C: A água desloca o nucleófilo; D: Dissociação e da aglicona (xilobiose) do sítio ativo permitindo um movimento enzimático para uma nova posição do substrato. (JEFFRIES, T. W, 1996).

### 1.2.3.2. Produção de xilanases termofílicas

Na indústria de alimentos, há vários anos, as enzimas de microrganismos são usadas em processos como: panificação, produção de álcool, produção de queijo, clarificação de sucos e cervejas entre outros. O avanço das pesquisas sobre as características físico-químicas e de

purificação das enzimas, tem possibilitado o surgimento de novas aplicações enzimáticas na indústria (DEMIRIJAN et al., 2001).

Em panificação a maioria dos estudos mostra a aplicação de xilanases mesofílicas sobre a melhoria da qualidade de pães e pouco se encontra com relação à xilanases termofílicas (KATINA et al., 2006; CABALLERO; GÓMEZ; ROSELL, 2007). Uma vantagem do uso de xilanase termoestável adviria de sua ação continuada mesmo a temperaturas superiores a temperatura de gelatinização do amido.

Outra vantagem importante do uso de enzimas termofílicas nos processos industriais que requerem altas temperaturas é a diminuição dos riscos de contaminação microbiológica, comum quando se utiliza microrganismo mesofílico no processo (BECKER, 1997).

Segundo Kumar; Nussinov, (2001) os microrganismos termofílicos sintetizam proteínas e enzimas que são resistentes à desnaturação por altas temperaturas e à proteólise, devido à presença de um número maior de forças estabilizadoras como as interações eletrostáticas, pontes dissulfeto, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

Para Everly; Alberto, (2000) a resistência a altas temperaturas e a proteólise é devido aos ácidos graxos saturados que compõem a membrana celular desses microrganismos. Essas moléculas podem se agrupar de forma uniforme em arranjos quase cristalinos, e por esse motivo apresentam ponto de fusão maior que dos ácidos graxos insaturados, fornecendo assim, um ambiente seguro para a célula que permanece íntegra para viver a altas temperaturas.

Um melhor entendimento da capacidade que as proteínas e enzimas de microrganismos termofílicos têm de resistir a altas temperaturas faz-se necessário, e isso pode ser possível com o uso de novas metodologias que indiquem claramente as diferenças na estrutura dessas moléculas nos organismos termofílicos e mesofílicos.

Fungos filamentosos como o *Thermoascus aurantiacus* são particularmente interessantes para a produção de xilanases do ponto de vista da indústria, devido ao fato deles excretarem as enzimas que degradam a xilana para o meio extracelular, eliminando assim a necessidade da ruptura celular para obtenção das enzimas. Além do mais, a produção de xilanases a partir de culturas de fungos é maior do que a partir de culturas de bactérias. Os fungos sintetizam uma variedade de xilanases que são necessárias para uma completa degradação da xilana (HALTRICH et al., 1997).

Kohilu et al. (2001), relataram que membros da família *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Thermoascus aurantiacus* e *Fusarium proliferatum* sintetizam xilanases que catalisam reações à temperatura ótima entre 50 °C e 80 °C.

Em geral, o conhecimento dos parâmetros como temperatura, pH, estabilidade enzimática e cinética, entre outros, são importantes para a aplicabilidade industrial satisfatória de qualquer enzima.

### 1.2.3.3. Aplicação industrial das xilanases

As enzimas que degradam a xilana têm atraído muita atenção nos últimos anos devido a sua importante aplicação prática em vários processos industriais, incluindo a modificação de gêneros alimentícios a base de cereais, melhoramento da digestibilidade das rações oferecidas a animais, clareamento de bebidas como cervejas e sucos, branqueamento da polpa do papel, reciclagem de resíduos agrícolas e florestais e produção de biocombustível entre outros (SORENSEN et al., 2004).

As hemicelulases são enzimas endógenas dos cereais principalmente do trigo. É um grupo de enzimas relativamente novo no que se refere a sua aplicação na indústria de panificação (SLUIMER, 2005). O uso de xilanases selecionadas no processo de panificação provoca mudanças na reologia da massa como: tempo de desenvolvimento, consistência, extensibilidade e resistência à quebra. Essas mudanças podem ser vistas no produto final, o pão, principalmente como o melhor desenvolvimento do volume e estrutura do miolo (POUTANEN, 1997; COURTIN, GELDERS, DELCOUR, 2001).

As xilanases também podem influenciar as propriedades nutricionais dos alimentos a base de cereais, pela modificação da população dos carboidratos não amiláceos. Segundo Haskell et al. (1992); Glore et al. (1994) as arabinoxilanas solúveis em água são associadas a efeitos benéficos à saúde como: diminuição dos níveis de colesterol associado à redução dos riscos de doenças do coração e diabetes tipo II.

As arabinoxilanas presentes nas dietas de aves domésticas a base de cereais como aveia, arroz e trigo são conhecidas por contribuir para o seu efeito antinutritivo, o qual está relacionado à propriedade das arabinoxilanas em aumentar a viscosidade das rações, dificultando a absorção intestinal dos nutrientes. As xilanases adicionadas ao processo de fabricação das rações degradam as arabinoxilanas da parede celular dos cereais, resultando num aumento à acessibilidade dos nutrientes e/ou a liberação de fragmentos de xilana considerados prebióticos (CHOCT; ANNISON, 1990).

Na indústria de bebidas, como a de cervejas, vinhos e sucos, as xilanases são adicionadas ao processamento para proporcionar uma diminuição da viscosidade, redução da opacidade e aumento da capacidade de ligação dos fragmentos de arabinoxilanas à água melhorando a filtração e prevenindo o entupimento das membranas filtrantes (SORENSEN et al., 2004).

Viikari et al. (1987) foram os primeiros a demonstrarem com detalhes que o tratamento da polpa de papel com hemicelulases, especialmente as xilanases reduz o requerimento de cloro para o branqueamento do papel. As xilanases degradam a xilana dentro da polpa do papel e rompem as fortes associações entre a celulose, lignina e hemicelulose permitindo assim, o acesso dos produtos químicos.

Anualmente toneladas de resíduos agroindustriais e florestais são geradas na natureza, sendo essa biomassa formada de celulose, lignina e hemicelulose, mas há vários anos, as xilanases estão sendo utilizadas como uma alternativa para reciclar esses resíduos. As xilanases juntamente com outras enzimas como as manases, ligninases, e celulases são empregadas para a geração de biocombustíveis como o etanol e o xilitol (GALBE; ZACCHI, 2002).

#### 1.2.4. Ciclodextrina

Villiers (1891), citado por Brewster; Loftsson (2007) foi o primeiro a relatar a existência de dextrina a partir da hidrólise de amido por *Bacillus amylobacter*, ele as denominou de “celulosina”, por sua semelhança com a celulose no que diz respeito à resistência à hidrólise ácida e por ser uma molécula não-redutora. Posteriormente Schardinger (1903), citado por Brewster; Loftsson (2007) observou que uma linhagem de bactérias isoladas de alimentos deteriorados fermentava o amido com a produção de dois compostos cristalinos que ele distinguiu pela reação de iodo como sendo  $\alpha$ -dextrina e  $\beta$ -dextrina. Schardinger identificou a  $\beta$ -dextrina como sendo a “celulosina” identificadas anteriormente por Villiers. Hoje estes compostos são denominados de ciclodextrinas ou menos comumente de ciclomaltodextrina.

A  $\gamma$ -ciclodextrina foi primeiramente descrita em 1935 por Freudenberg; Jacobi. Em 1938 Freudenberg; Cramer, citado por Brewster; Loftsson (2007) identificaram a estrutura química das ciclodextrinas, suas propriedades físico-químicas e sua capacidade de formar complexos de inclusão.

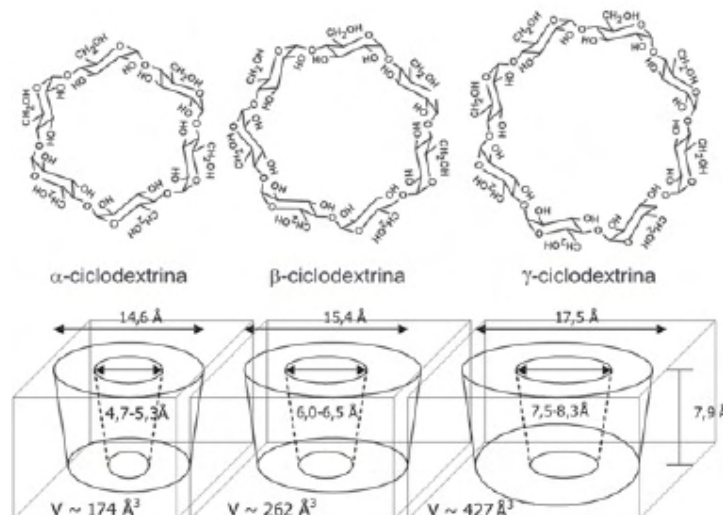
Nos anos que se seguiram a descoberta de Freudenberg; Cramer (1935), apenas pequenas quantidades de CDs foram produzidas, prejudicando a exploração pela indústria desses novos oligossacarídeos. O avanço biotecnológico na década de 1970 e a comprovação da não toxicidade das CDs direcionaram as pesquisas para uma melhora dramática na produção em grande escala das três formas de ciclodextrina pura, transformando um processo químico caro e peculiar em um processo acessível (OGUMA; KAWAMOTO, 2003).

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos derivado da molécula de amido ou maltodextrina, contendo seis ( $\alpha$ -CD), sete ( $\beta$ -CD), oito ( $\gamma$ -CD), nove ( $\delta$ -CD), dez ( $\epsilon$ -CD) ou mais resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, respectivamente. Devido a forma de cadeira das unidades glicopiranosil, as CDs apresentam uma forma de cone truncado ao invés de um cilindro perfeito (**Figura 1.12**) (LARSEN, 2002).

Os grupos hidroxil (OH) são orientados para o exterior do cone, com os grupos OH primários dos resíduos de glicose na borda estreita do cone e os grupos OH secundários na borda ampla do cone. A cavidade central da ciclodextrina é linear formada pelo esqueleto carbônico e moléculas de oxigênio dos resíduos de glicose, o que fornece um caráter

relativamente hidrofóbico à cavidade. Os grupos hidroxil formam pontes de hidrogênio com moléculas de água circunvizinhas, resultando na hidratação da estrutura da molécula da ciclodextrina (LOFTSSON; BREWSTER, 1996; WINKLER et al., 2000).

Em virtude da estrutura geométrica das ciclodextrinas com a cavidade interna hidrofóbica e a região externa hidrofílica, é possível a formação de complexos de inclusão cristalinos com uma variedade de compostos sólidos, líquidos e gasosos. Esse fenômeno é denominado de *encapsulação ou interação molecular* (YU; AOKI; MISAWA, 1988).



**Figura 1.12.** Estrutura físico-química das  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CDs (VENTURINI et al., 2008).

As moléculas interagem com as ciclodextrinas através de ligações não covalentes simultâneas tais como: pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas, interações dipolo-dipolo, transferências de cargas e efeitos estéreo. A formação de complexos de inclusão altera significativamente as características da molécula encapsulada. Estas alterações incluem modificações na reatividade química, fixação de substâncias voláteis, melhoria na solubilidade, estabilização de substâncias sensíveis à luz, calor e oxidação, proteção da degradação de substâncias por microrganismos, mascaramento de corantes ou pigmentos e de uma ampla variedade de compostos usados em alimentos, fármacos, cosméticos, produtos agrícolas e indústria química (SZEJTLI, 1992; BIWER; ANTRANIKAN; HEINZLE, 2002; VENTURINI et al., 2008).

O mecanismo completo da formação dos complexos de inclusão é realizado em várias etapas, as quais envolvem a dessolvatação do substrato e a dessolvatação interna da ciclodextrina, mudanças conformacionais do receptor e do substrato, interação receptor-substrato, uma reorganização do solvente em torno e no interior da cavidade e a relaxação estrutural do complexo (LIPKOWITZ, 1998; REKHARSKY; INOUE, 1998; LO MEO et al., 2003).

Tabushi et al. (1978) afirmaram que a estabilização do complexo da CD com o substrato por forças de van der Waals e a remoção da água de solvatação do substrato apolar são

fatores responsáveis pela entalpia de inclusão. O aumento da entropia devido à quebra da estrutura de solvatação do substrato apolar fornece a energia necessária para estabilizar o complexo de inclusão (LIPKOWITZ, 1998).

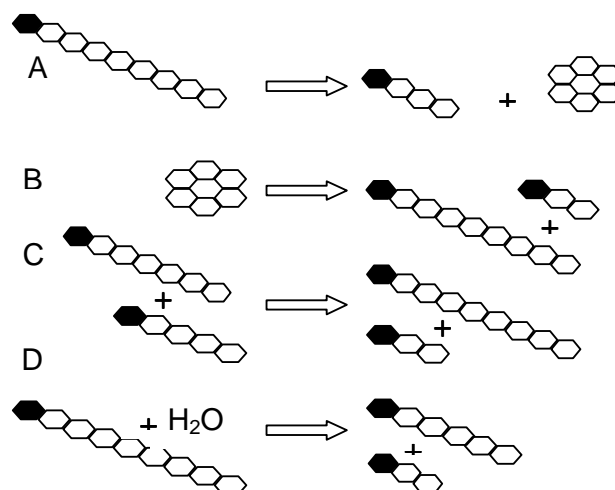
Grupos carregados, como amônio e carboxilato, ou grupos hidrofílicos, como hidroxila, amino e carboxila, permanecem expostos à solvatação do meio mesmo após a inclusão em ambiente hidrofílico (ROSS; REKHARSKY, 1996).

Entre as três ciclodextrinas, a  $\beta$ -CD é a de maior interesse, devido ao tamanho da sua cavidade hidrofóbica a qual é adequada para acomodar muitas moléculas semelhantes a compostos aromatizantes e drogas (SZEJTLI, 1992; DOUKYU; KUWAHARA; AONO, 2003).

#### 1.2.4.1. Ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase)

A ciclodextrina glicosiltransferase (EC 2.4.1.19, CGTase) é uma enzima que catalisa uma reação de transglicosilação intramolecular ou ciclização da molécula de amido e/ou da molécula de maltodextrina linear produzindo produtos denominados de ciclodextrinas (CDs) (BLACKWOOD; BUCKE, 2000).

As CGTases também catalisam outras duas reações: a reação de acoplamento que é reversa a ciclização, onde as ciclodextrinas são clivadas e transferidas a um receptor linear (dextrinas lineares) e a reação de desproporcionação no qual dois oligossacarídeos lineares são convertidos em dois oligossacarídeos lineares de tamanhos diferentes (Van Der Veen, 2000). Em adição, estas enzimas possuem também uma fraca atividade hidrolítica, onde o amido é hidrolisado a dextrinas lineares e a água é o aceptor glicosil (BLACKWOOD; BUCKE, 2000; JEMLI et al., 2007) (Figura 1.13).



**Figura 1.13.** Reações catalisada pela CGTase. Os hexágonos representam os monômeros de glicose, os preenchidos indicam os monômeros com carbono anomérico livre (redutores). (A) ciclização, (B) acoplamento, (C) desproporcionação, (D) hidrólise. (Adaptado de VAN DER VEEN, et al, 2000).

As CGTases são enzimas extracelulares e são sintetizadas por uma variedade de microrganismos, incluindo bactérias e recentemente também foram descobertas em archaea (*Bacillus*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Thermoanaerobacter* e *Thermoanaerobacterium*). Todas as CGTases produzem uma mistura de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrina por meio da reação de ciclização e a produção de diferentes ciclodextrinas e suas proporções dependem das condições de reação e principalmente da fonte microbiana da enzima. Deste modo, as CGTases podem ser classificadas de acordo com sua principal ciclodextrina produzida, alfa, beta ou gama-ciclodextrina. (BLACKOOD; BUCKE, 2000; VENTURINI et al., 2008).

Enzimas que sintetizam predominantemente um tipo de CD são ideais para a aplicação industrial, pois o processo de separação de uma mistura de CDs é caro. Atualmente muitas CGTases são geneticamente modificadas para melhorar a produção e seletividade das ciclodextrinas (BIWER; ANTRANIKIAN; HEINZLE, 2002)

A atividade da CGTase é comumente verificada usando a propriedade que a  $\beta$ -CD sintetizada pela ação da CGTase tem de formar complexos de inclusão coloridos com a fenoltaleína em pH básico. Assim, a concentração de  $\beta$ -CD é estimada espectrofotometricamente. Os tubos contendo os complexos de inclusão apresentam uma coloração mais clara com relação aos tubos onde não há formação do complexo, neste caso a fenoltaleína assume sua cor característica em pH básico (vermelho intenso) (USANOV et al., 2007).

#### 1.2.4.2. Produção e aplicação industrial da ciclodextrina

Comumente as CDs são industrialmente produzidas por dois tipos de processos distintos: o primeiro processo envolve o uso solvente e o outro processo não. No primeiro uma molécula orgânica principalmente o tolueno, álcool etílico ou acetona são usados para complexar e precipitar as CDs liberadas pela ação da CGTase. No segundo processo o agente complexante não é adicionado, portanto, uma mistura de diferentes CDs é formada. O segundo processo foi desenvolvido para a produção de  $\beta$ -CD, por esta ser uma molécula menos solúvel que pode ser facilmente separada das outras formas de CDs pelo processo de cristalização (BIWER; ANTRANIKIAN; HEINZLE, 2002).

As ciclodextrinas produzidas pelo processo sem agentes complexantes orgânicos podem ser aplicadas na indústria de alimentos sem restrição, enquanto as CDs produzidas com adição de solventes apresentam várias desvantagens como toxicidade, inflamabilidade e o solvente têm que ser recuperado no final do processo por uma questão econômica (VAN DER VEEN et al., 2000; BIWER; ANTRANIKIAN; HEINZLE, 2002).

A produção e seletividade das CDs dependem do substrato, da origem da CGTase, do agente complexante e das condições de reação. O amido consiste de amilose e amilopectina, ambas servem como substrato para a CGTase (BLACKOOD; BUCKE, 2000; GRULL; STIFTER, 2001).

Para a produção industrial das ciclodextrinas o amido de batata é o mais usado. O amido de milho contém alto teor de amilose (25%), mas a presença de complexos de amilose-lipídeos nos amidos de cereais, é um fator que dificulta o sucesso da ação da CGTase na conversão em ciclodextrina. Já o amido de mandioca e milho ceroso são substratos ideais para a ação da CGTase. (GRULL; STIFTER, 2001; BIWER; ANTRANIKIAN; HEINZLE, 2002; ALVES-PRADO et al., 2008).

As CDs são normalmente vendidas como um pó fino e cristalino, o qual permanece estável por um longo tempo. Devido à fácil purificação, o preço da  $\beta$ -CD tem diminuído significativamente, enquanto, a  $\alpha$ -CD e a  $\gamma$ -CD ainda são caras para a aplicação industrial (BIWER; ANTRANIKIAN; HEINZLE, 2002).

Como já mencionado anteriormente, as ciclodextrinas (CDs) são capazes de formar complexos de inclusão com várias moléculas hidrofóbicas, alterando suas propriedades físico-químicas. Esta característica faz as CDs atrativas para aplicação em diferentes campos como a indústria de alimentos, químicas, farmacêuticas e têxteis, na agricultura e proteção ambiental (BIWER; ANTRANIKIAN; HEINZLE, 2002; BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

A  $\beta$ -ciclodextrina é mais usada na indústria para a formação de complexos de inclusão, devido à facilidade de produção, pois é mais estável e menos solúvel em água, sendo assim mais fácil sua separação das outras CDs. Em adição, a produção de  $\beta$ -ciclodextrina a partir de amido é maior que as outras CDs (BONILHA, et al., 2006)

Um dos aspectos que seguramente reveste as CDs de grande importância para serem potencialmente aplicadas em processos industriais refere-se à solubilidade de moléculas insolúveis em água. Na indústria farmacêutica as CDs são usadas para solubilizar e dissolver drogas, por exemplo: Uzqueda et al. (2006) analisaram as interações do antifúngico naftifina com  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, e observaram um aumento na solubilidade do fármaco em 5 e 2 vezes, respectivamente.

A resolução nº 205 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) regulamenta o uso de enzimas e preparações enzimáticas na produção de alimentos destinados ao consumo humano. As enzimas são consideradas coadjuvantes de tecnologia, capazes de provocar alterações desejáveis nas características de um alimento, e são classificadas quanto a sua origem: como animal, vegetal e microbiana. No caso de enzimas e preparações enzimáticas que contenham enzima de origem microbiana, deve-se constar o nome do microrganismo que deu origem à enzima e não devem ser utilizados microrganismos patogênicos na sua produção (BRASIL, 2006).

Os alimentos que contém em sua formulação ácidos graxos insaturados, como óleos de peixe e óleos vegetais, corantes naturais ou artificiais são facilmente degradados pela luz, oxigênio, calor e processos de descongelamento, resultando em produtos com sabor, odor e aparência desagradáveis. Estas alterações nos alimentos podem ser reduzidas e até mesmo evitadas pela complexação desses ingredientes com as ciclodextrinas (HEDGES, 1998).

Alimentos coloridos com ingredientes naturais como o ketchup, apresentou alta estabilidade a temperatura de até 100°C quando adicionado de 0,2% de  $\beta$ -CD (KAWASHIMA, 1980). Neste trabalho a  $\beta$ -CD encapsulou a molécula de licopeno e evitou sua degradação pelo calor.

Outra aplicação interessante das CDs em alimentos é quando estas são usadas para reduzir a perda de aroma e inibir o crescimento microbiológico durante o armazenamento. A interação de aromas com as CDs é ainda de especial interesse para a indústria de alimentos (TOBITSUKA; MIURA; KOBAYASHI, 2005).

A adição de CDs em alimentos emulsificados como maioneses e queijos podem aumentar a retenção de água e a vida útil do produto. Em processamento de produtos cárneos as CDs também aumentam a retenção de água e melhoram a textura (OTA; TAKEDA, 1981).

O sabor amargo de fármacos, alimentos ou de qualquer outra substância dissolvida em solução aquosa ou na saliva, pode ser reduzido ou totalmente eliminado se o componente amargo formar um complexo de inclusão com uma CD apropriada (SZEJTLI; SZENTE, 2004).

Na indústria de cosméticos, vitaminas lipossolúveis como retinol e tocoferol são produtos essenciais para o embelezamento da pele, mas por serem compostos naturais podem sofrer degradação induzida por oxidação e pela luz. A formação do complexo de inclusão desses compostos com as ciclodextrinas protege-os contra a degradação (ZHAOFENG et al., 2007).

Na indústria química, as CDS podem ser usadas em processos de separação devido a sua habilidade de discriminar isômeros posicionais, grupos funcionais, homólogos e enantiômeros (HAN, 1997).

As ciclodextrinas também são aplicadas no setor agrícola e na proteção do meio ambiente. Complexos de inclusão podem ser formados com vários produtos agrícolas incluindo herbicidas, agentes reguladores de plantas, inseticidas e fungicidas, reduzindo assim, a toxicidade dos produtos químicos agrícolas e permitindo uma liberação controlada destes no meio ambiente. Atualmente a proteção ambiental é uma preocupação constante e as CDs vêm sendo usadas para complexar moléculas poluentes e metais pesados do solo, água e atmosfera (ZHAOFENG et al., 2007).

### 1.3. Referências

ALVES-PRADO, H. F; CARNEIRO, A. A. J; PAVEZZI, F; C; GOMES, E; BOSCOLO, M; FRANCO, C. M. L; DA SILVA, R. Production of cyclodextrins by CGTase from *Bacillus clausii* using different starches as substrates. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 146, p. 3-13, 2008.

BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 253-368, 1992.

BECKER, P. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 48, p. 184-190, 1997.

BEG, Q. K; KAPOOR, M; MAHAJAN, L; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 326-338, 2001.

BIELY, P; PULS, J; SCHNEIDER, H. Acetyl xylan esterases in fungal cellulolytic systems. **FEBS Letters**, v. 186, p. 80-84, 1985.

BIWER, A; ANTRANIKAN, G; HEINZLE, E. Enzymatic production of cyclodextrins. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, p. 609-617, 2002.

BLACKWOOD, A. D; BUCKE, C. Addition of polar organic solvents can improve the product selectivity of cyclodextrin glycosyltransferase solvent effects on CGTase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 704-708, 2000.

BONILHA, P. R. M; MENOCCI, V; GOULART, A. J; POLIZELI, M. L. T. M; MONTI, R. Cyclodextrin glycosyltransferase from *bacillus licheniformis*: optimization of production and its properties. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 317-323, 2006.

BOUVENG, H. O. Phenylisocyanate derivatives of carbohydrates. II. Location of O-acetyl groups in birch xylan. **Acta Chemistry Scandinavica**, v. 15, p. 96-100, 1961.

BOYLE, P. J.; HEBEDA, R. E. Antistaling enzymes for baked goods. **Food Technology**, v. 44, p. 129, 1990.

BRASIL. Resolução RDC nº205, de 14 de novembro de 2006. **Aprova o Regulamento Técnico sobre Enzimas e Preparações Enzimáticas para Uso na Produção de Alimentos Destinados ao Consumo Humano**. Diário Oficial da União, Brasília, 17 de novembro de 2006.

BRASIL. Portaria nº91, de 25 de fevereiro de 2010. **Aprova o regulamento técnico do trigo, definindo o seu padrão oficial de classificação, com os requisitos de identidade e qualidade, a amostragem, o modo de apresentação e a marcação ou rotulagem**.

BREWSTER, M. E; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 645-666, 2007.

BULÉON, A; COLONNA, P; PLANCHOT, V; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis – Mini review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, p. 85-112, 1998.

CABALLERO, P. A; GÓMEZ, 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.

CHOCT, M; ANNISON, G. The anti-nutritive activity of wheat pentosans in broiler diets. **British Poultry Science**, v. 65, p. 811-821, 1990.

CLUSKEY, J. E; TAYLOR, N. W; SENTI F. R. Relation of the rigidity of flour, starch, and gluten gels to bread staling. *Cereal Chem.* V. 36, p. 236-246, 1959.

COLLINS, T; GERDAY, C; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3-23, 2005.

- COLLINS, T; HOYOUX, A; DUTRON, A; GEORIS, J; GENOT, B; DAUVRIN, T; ARNAUT, F; GERDAY, C; FELLER, G. Use of glycoside hydrolase family 8 xylanases in baking. **Journal of Cereal Science**, v. 43, p. 79–84, 2006.
- COURTIN, C. M; DELCOUR, J. A. Relative activity endoxylanases towards water-extractable and unextractable arabinoxylan. **Journal of Cereal Science**. 33, p. 301–312, 2001.
- COURTIN, C. M; DELCOUR, J. A. Arabinoxilans and endoxylanases in wheat flour bread-making. **Journal of Cereal Science**, v. 35, p. 225-243, 2002.
- COURTIN, C. M; GELDERS, G. G; DELCOUR, J. A. The use of two endoxylanases with different substrate selectivity provides insight into the functionality of arabinoxylans in wheat flour breadmaking. **Cereal Chemistry**, v. 78, p. 564–571, 2001.
- COURTIN, C. M; ROELANTS, A; DELCOUR, J. A. Fractionation-reconstitution experiments provide insight into the role of endoxylanases in bread-making. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p.1870- 1877, 1999.
- DAVIES, G; HENRISSAT, B. Structure and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, p. 853-859, 1995.
- DEKKER, R. F; RICHARDS, G. N. Hemicellulases: their occurrence, purification, properties, and mode of action. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 32, p. 277-352, 1976.
- DEMIRIJAN, D; MORIS-VARAS, F; CASSIDY, C. Enzymes from extremophiles. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, p. 144-151, 2001.
- DOUKYU, N; KUWAHARA, H; AONO, R. Isolation of *Paenibacillus illinoisensis* that produces cyclodextrin glucanotransferase resistant to organic solvents. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 67, p. 334-340, 2003.
- ELIASSEN, A. C. Retrogradation of starch as measured by differential scanning calorimetry. In: HILL, R. D; MUNCK, L. **New Approaches to Research on Cereal Carbohydrates**. Amsterdam: Elsevier, p. 93-98. 1986.
- ELIASSEN, A. C; LARSSON, K. **Cereals in breadmaking: a molecular colloidal approach**. New York: Marcel Dekker, 2007.
- EVERLY, C; ALBERTO, J. Stressors. Stress and survival: overview. **Front. Bioscience**, v. 5, p. 780-786, 2000.
- FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESRADO DO PARANÁ. *Relatório farinha de trigo 0606*. Disponível em: [http://www.fierp.org.br/fierp/conselhos/agroindustri\\_alimentos](http://www.fierp.org.br/fierp/conselhos/agroindustri_alimentos). Acesso em: fev. 2010.
- FRANCO, C. M. L. et al. **Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas, propriedades gerais do amido**. Campinas: Fundação Cargill, v.1, 2001.
- FRENCH, D. Chemical and physical properties of starch. **Journal of Animal Science**, v. 37, p. 1048-1061, 1973.
- FRENCH, D. Organization of starch granules. In: WHISTLER, R. L; BEMILLER, J. N; PASCHAL, E. F. **Starch: chemistry and technology**. 2. ed. London: Academic Press, p. 183-247, 1984.
- GALBE, M; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, p. 618-628, 2002.
- GOESAERT, H; BRIJS, K; VERAVERBEKE, W. S; COURTIN, C. M; GEBRUERS, K; DELCOUR, J. A. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. **Food Science & Technology**, v.16, p.12-30, 2005.
- GLORE, S. R; VAN TREECK, D; KNEHANS, A. W; GUILD, M. Soluble fiber and serum lipids: a literatura review. **Journal American Dietary Association**, v. 94, p. 425-436, 1994.

GRAY, J. A; BEMILLER, J. N. Bread staling: molecular basis and control. **Comprehensive Reviews in Food Science and food Safety**, v. 2, p. 1-21, 2003.

GRULL D, STIFTER U. **Process for the production of cyclodextrin**. US Patent 6 235 505, 2001.

GRUPPEN, H; HAMER, R. J; VORAGEN, A. G. J. Water- unextractable cell wall material from wheat flour. I. Extraction of polymers with alkali. **Journal of Cereal Science**, v. 16, p. 41-51, 1992.

GUJRAL, H. S; GUARDIOLA, I; CARBONELL, J. V; ROSELL, C. M. Effect of Cyclodextrinase on Dough Rheology and Bread Quality from Rice Flour. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3814-3818, 2003.

HALTRICH, D; NIDETZKY, B; KULBE, K. D; STEINER, W; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 137-161, 1997.

HAN S. M. Direct enantiomeric separations by high performance liquid chromatography using cyclodextrins. **Biomedical Chromatography** ,v. 11, p. 259–271, 1997.

HAROS, M; ROSELL, C. M; BENEDITO, C. Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling. **European Food Research and Technology**, v. 215, p. 425-430, 2002.

HASKELL, W. L; SPILLER, G. A; JESEN, C. D; ELLIS, B. K; GATES, J. E. Role of water-soluble dietary fiber in the management of elevated plasma cholesterol in healthy subjects. **American Journal Cardiology**, v. 69, p. 433-469, 1992.

HE. H, HOSENEY, R. C. Changes in bread firmness and moisture during long-term storage. **Cereal Chemistry**, v. 67, p. 603-605, 1990.

HEDGES, A. R. Industrial applications of cyclodextrins **Chemical Reviews**, v. 98, p. 2035-2044, 1998.

HIZUKURI, S; TAKEDA, Y; YASUDA, M. Multi-branched nature of amylose and the action of debranching enzymes. **Carbohydrate research**, v. 94, n. 2, p. 205-209, 1981.

HOSENEY, R. C. Fuctional properties of pentosans in baked foods. **Food Technology**, v. 38, p. 114-117, 1984.

HOSENEY, R.C. **Principios de Ciencia y Tecnología de los Cereals**. In: HOSENEY, R. C. Zaragoza-España: Acibia, S. A, 1991.

JEMLI, S; MESSAOUD, E. B; AYADI-ZOUARI, D; NAILI, B; KHEMAKHEM, B; BEJAR, S. A  $\beta$ -cyclodextrin glycosyltransferase from a newly isolated *Paenibacillus pabuli* US132 strain: Purification, properties and potential use in bread-making. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 44-50, 2007.

JEFFRIES, T. W. Biochemistry and genetics of microbial xylanases. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 337-342, 1996.

JOHNSON, D. G; SILVA, M. C; MACKENZIE, C. R; SCHNEIDER, H; FONTANA, J. D. Microbial degradation of hemicellulosic materials. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 20-21, p. 245-258, 1989.

KALOGERIS, E; CHRISTAKOPOULOS, P; KEKOS, D; MACRIS, B. J. Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: Characterization of two isozymes. **Journal Biotechnology**, v. 60, p. 155-163, 1998.

KATINA, K; SALMENKALLIO-MARTTILA, M; PARTANEN, P; FORSSELL, P; AUTIO, K. Effects of sourdough and enzymes on staling of high-fibre wheat bread. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie-Food Science and Technology**, v. 39, p. 479-491, 2006.

KAWASHIMA, K. **Prevention of discoloration of food colorants**. Jpn. Kokai JP Patente 8071464, 1980.

- KOHILU, U; NIGAM, P; SINGH, D; CHAUDHARY, K. Thermostable, alkaliphilic and cellulase free xylanases production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 28, p. 606-610, 2001.
- KORMELINK, F. J. M; GRUPPEN, H; WOOD, T. M; BELDMAN, G. Mode of action of the xylan-degrading enzymes from *Aspergillus awamori*. In: VISSER, J; BELDMAN, G; KUSTERS-VAN SOMEREN, M. A; VORAGEN, A. G. J. **Xylans and Xylanases**. Amsterdam: Elsevier, p. 141-147, 1992.
- KULKARNI, N; SHENDYE, A; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 411-456, 1999.
- KUMAR, S; NUSSINOV, R. How do thermophilic proteins deal with heat? A review. **Cellular Molecular Life Science**, v. 58, p. 1216-1233, 2001.
- LARSEN, K. L. Large cyclodextrins. **Journal of Inclusion Phenomena Macrocyclic Chemistry**, v. 43, p. 1-13, 2002.
- LEE, S. H; KIM, Y. W; LEE, S; AUH, J. H; YOO, S. S; KIM, T. J; KIM, J. W; KIM, S. T; RHO, H. J; CHOI, J. H; KIM, Y. B; PARK, K. H. Modulation of Cyclizing Activity and Thermostability of Cyclodextrin Glucanotransferase and Its Application as an Antistaling Enzyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1411-1415, 2002.
- LEUNG, H. K; BRUINSMA, B. L. Water binding of wheat flour doughs and breads as studied by deuteron relaxation. **Journal Food Science**, v. 48, p. 95-99, 1983.
- LI, K; AZADI, P; COLLINS, R; TOLAN, J; KIM, J; ERIKSSON, K. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 27, p. 89-94, 2000.
- LINEBACK, D. R. The starch granule: organization and properties. **Bakers Digest**, v. 58, p. 16-21, 1984.
- LIPKOWITZ, K. B. Applications of computational chemistry to the study of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 1829-1873, 1998.
- LIYAMA, K; LAM, T. B. T; STONE, B. A. Covalent cross-links in the cell wall. **Plant Physiology**, v. 104, p. 315-320, 1994.
- LOFTSSON, T; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. **Journal Pharmacy Science**, v. 85, p. 1017-1025, 1996.
- LO MEO, P; D'ANNA, F; RIELA, S; GRUTTADAURIA, M; NOTO, R. Spectrophotometric study on the thermodynamics of binding of alpha- and beta-cyclodextrin towards some p-nitrobenzene derivatives. **Organic Biomolecular Chemistry**, v. 1, p. 1584-1590, 2003.
- MACKENZIE, C. R; BILOUS, D. Ferulic acid esterase activity from *Schizophyllum commune*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1170-1173, 1988.
- MAGEE, R. J; KOSARIC, M. Bioconversion of hemicellulose. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 32, p. 61-93, 1985.
- MALEKI, M; HOSENEY, R. C; MATTERN, P. J. Effects of loaf volume, moisture content, and protein quality on the softness and staling rate of bread. **Cereal Chemistry**, v. 57, p. 138-140, 1980.
- MARTIN, M. L.; ZELEZNAK, K. J; HOSENEY, R. C. A mechanism of bread firming. I. Role of starch swelling. **Cereal Chemistry**, v. 68, p. 503-507, 1991.
- MARTIN, M. L.; HOSENEY, R. C. A mechanism of bread firming. II. Role of starch hydrolyzing enzymes. **Cereal Chemistry**, v. 68, p. 498-503, 1991.
- MIAO, S. C; ZISER, L; AEBERSOLD, R; WITHERS, S. G. Identification of glutamic acid 78 as the nucleophile in *Bacillus subtilis* xylanase using electrospray tandem mass spectrometry. **Biochemistry**, v. 33, p. 7027-7032, 1994.

- MISHRA, C; KESKAR, S; RAO, M. Production and properties of extracellular endoxylanases from *Neurospora crassa*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 48, p. 224-228, 1984.
- MÜLLER-HARVEY, I; HARTLEY, R. D; HARRIS, P. J; CURZON, E. H. Linkage of *p*-coumaryl and feruloyl groups to the cell wall polysaccharides of barley straw. **Carbohydrate Research**, v. 148, p. 71-85, 1986.
- OGUMA, T; KAWAMOTO, H. Production of cyclodextrin and its applications. **Trends Glycoscience Glycotechnology**, v. 15, p. 91-99, 2003.
- OTA, T; TAKEDA, F. Cyclodextrins as cheese additives. **Jpn. Kokai JP 8175060**, 1981.
- POMERANZ, Y. **Wheat: chemistry and technology**. 3. ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemistry, v. 1, 1988.
- POUTANEN, K. An important tool in the improvement of the quality of cereal foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, p.300-306, 1997.
- PRABHASANKAR, P; INDRANI, D; JYOTSNA, R; RAO, G. V. Influence of enzymes on rheological, microstructure and quality characteristics of parotta – na unleavened Indian flat bread. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 2128-2134, 2004.
- PRADE, R. A. Xylanases: from biology to biotechnology. **Biotechnology Genetics Engineering Reviews**, v. 13, p. 100-131, 1995.
- PULS, J; SCHMIDT, O; GRAZOW, C. -Glicuronidases in two microbial xylanolytic systems. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 9, p. 83-88, 1987.
- PULS, J; SCHUSEIL, J. Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzyme required for hydrolysis. In: COUGHLAN, M. P; HAZLEWOOD, G. P. **Hemicelluloses and Hemicellulases**. London: Portland Press, p. 1-27, 1993.
- REILY, P. J. Xylanases: Structure and function. **Basic Life Sciences**, v. 18, p. 11-129, 1981.
- REKHARSKY, M. V; INOUE, Y. Complexation thermodynamics of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 1875-1917, 1998.
- REVANAPPA, S. B; SALIMATH, P. V. Structural characterization of hemicellulose A from wheat (*Triticum aestivum*) varieties differing in their chapati-making quality. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 655-659, 2010.
- RIBOTTA, P. D; BAIL, A. LE. Thermo-physical assessment of bread during staling. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie-Food Science and Technology**, v. 40, p. 879-884, 2007.
- ROSS, P. D; REKHARSKY, M. V. Thermodynamics of hydrogen bond and hydrophobic interactions in cyclodextrin complexes. **Biophysical Journal**, v. 71, p. 2144-2153, 1996.
- ROUAU, X; EL-HAYEK, M. L; MOREAU, D. Effect of an enzyme preparation containing pentosanases on the bread-making quality of flours in relation to change in pentosan properties. **Journal of Cereal Science**, v.78, p. 564-571, 2001.
- ROUBROEKS, J. P; ANDERSSON, R; MASTROMAURO, D. I; CHRISTENSEN, B. E; ÅMAN, P. Molecular weight, structure and shape of oat (1→3),(1→4)-β-D-glucan fractions obtained by enzymatic degradation with (1→4)-β-D-glucan 4-glucanohydrolase from *Trichoderma reesei*. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, p. 275-285, 2001.
- SCOCH, T. J; FRENCH, D. Studies on bread staling I. The role of starch. **Cereal Chemistry**, v. 24, p. 231-249, 1947.
- SENTI, F. R; DIMLER, R. J. Changes in starch and gluten during aging of Bread. **Baker's Dig.** V. 34, p. 28-32, 1960.

- SHIM, J. H; SEO, N. S; ROH, S. A; KIM, J. H; CHA, H; PARK, K. H. Improved Bread-Baking Process Using *Saccharomyces cerevisiae* Displayed with Engineered Cyclodextrin Glucanotransferase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4735-4740, 2007.
- SLUIMER, P. **Principles of breadmaking: functionality of raw materials and process steps**. St. Paul: American Association of Cereal Chemistry, 2005.
- SORENSEN, J.F. et al. Potential role of glycosidase inhibitors in industrial biotechnological applications. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1696, p. 275-287, 2004.
- SUBRAMANIYAN, S; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 33-64, 2002.
- SUNNA, A; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, p. 39-67, 1997.
- SZEJTLI, J. The cyclodextrins and their applications in biotechnology. **Carbohydrate Polymers**, v. 12, p. 375-392, 1992.
- SZEJTLI, J. Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 7, p. 575-587, 1997.
- SZEJTLI, L; SZENTE, J. Cyclodextrins as food ingredients. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 137-142, 2004.
- TABUSHI, I; KIYOSUKE, Y. I; SUGIMOTO, T; YAMAMURA, Approach to the Aspects of Driving Force of Inclusion by  $\alpha$ -Cyclodextrin K. **Journal of the American Chemical Society**, v. 100, p. 916-919, 1978.
- TAKENISHI, S; TSUJISAKA, Y. Structure of the oligosaccharides from the enzymic hydrolyzate of rice straw arabinoxylan by a xylanase of *Aspergillus niger*. **Agricultural Biology and Chemistry**, v. 37, p. 1385-1391, 1973.
- TENKANEN, M; POUTANEN, K. Significance of esterases in the degradation of xylans. In: VISSER, J; BELDMAN, G; KUSTERS-VAN SOMEREN, M. A; VORAGEN, A. G. J. **Xylans and Xylanases**. Amsterdam: Elsevier, p. 203-212, 1992.
- TIMELL, T. E. Wood hemicelluloses. **Advances Carbohydrate**, v. 19, p. 247-302, 1964.
- THOMAS, D. J; ATWELL, W. A. **Starch**. 1. ed. St. Paul: Eagan Press, 1999.
- TOBITSUKA, K; MIURA, M; KOBAYASHI, S. Interaction of cyclodextrins with aliphatic acetate esters and aroma components of La France pear. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5402-5406, 2005.
- UZQUEDA, M; MARTÍN, C; ZORNOZA, A; SÁNCHEZ, M; MARTÍNEZ-OHÁRRIZ, M. C; VÉLAZ, I. Characterization of complexes between naftifine and cyclodextrins in solution and in the solid state **Pharmaceutical Research**, v. 23. p. 980-988, 2006.
- USANOV, N. G; GIL'VANOVA, E. A; ELIZAR'EV, P. A; PRUTSAKOVA, E. A; MELENT'EV, I. A. An improved method of photometric determination of cyclodextrin glucanotransferase activity, **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 43, p. 105-110, 2007.
- VAN DER VEEN, B. A; VAN ALEBEEK, G. J. W. M; UIDEHAAGE, J. C. M; DISKSTRA, B. W; DISJKHUIZEN, L. The three from *Bacillus circulans* (strain 521) proceed via different kinetic mechanisms. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 658-665, 2000.
- VAN DER VEEN, P; FLIPPHI, M. J. A; VORAGEN, A. G. J; VISSER, J. Induction of arabinases from *Aspergillus niger* on monomeric substrates. In: VISSER, J; BELDMAN, G; KUSTERS-VAN SOMEREN, M.A; VORAGEN, A. G. J. **Xylans and Xylanases**. Amsterdam: Elsevier, p. 497-500, 1992.
- VENTURINI, C. G; NICOLINI, J; MACHADO, C; MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, p. 360-368, 2008

VIKARI, L.; POUTANEN, K.; RÄTÖ, M.; PULS, J. Evaluation of different microbial xylanolytic systems. **Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 49-60, 1987.

WILLHOFT, E. Bread staling II. Theoretical study. **Journal Science Food Agricultural**, v. 22, p. 180-185, 1971.

WINKLER, R. G.; FIORAVANTI, S.; CICCOTTI, G.; MARGHERITIS, C.; VILLA, M. Hydration of  $\beta$ -cyclodextrin: a molecular dynamics simulation study. **Journal Computational Aided Molecular Designed**, v. 14, p. 659-667, 2000.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of  $\alpha$ -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiology Reviews**, v. 52, p. 305-317, 1988.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N.; YAGUCHI, M. Purification of a tirad distinct xylanase from the xylanolytic system of *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 570-574, 1986.

WONG, D.W.S. **Mechanism and theory in food chemistry**, New York, Van Nostrand Reinhold, 1989.

WYNNE-JONES, S.; BLANSHARD, J. M. V. Hydration studies of wheat starch, amylopectin, amylose gels and bread by proton magnetic resonance. **Carbohydrate Polymers**, v. 6, p. 289-306, 1986.

YU, E. K. C.; AOKI, H.; MISAWA, M. Specific  $\alpha$ -cyclodextrin production by a novel thermostable cyclodextrin glycosyltransferase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 377-379, 1988.

ZHAOFENG, L.; MIAO, W.; FENG, W.; ZHENG BIAO, G.; GUOCHENG, D.; JING, W.; JIAN, C.  $\gamma$ -Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 245-255, 2007.

ZOBEL, H. F.; KULP, K. The staling mechanism. IN: HEBEDA, R.E.; ZOBEL, H. F. **Baked goods freshness**. New York. Marcel Dekker, p. 1-64, 1996.

CAPÍTULO II  
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA XILANASE E PRODUÇÃO DE  
CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE (CGTASE)

SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	39
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	40
<b>2.1. INTRODUÇÃO</b> .....	41
<b>2.2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
2.2.1. MATERIAL .....	42
2.2.2. MÉTODOS .....	42
2.2.2.1. Microrganismos e condições de cultura .....	42
2.2.2.2. Ensaio enzimático .....	43
2.2.2.3. Determinação de proteína dos extratos enzimáticos .....	44
2.2.2.4. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da xilanase .....	44
2.2.2.5. Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade da xilanase .....	45
2.2.2.6. Concentração dos extratos enzimáticos .....	45
2.2.2.7. Obtenção do glúten e efeito da protease .....	45
2.2.2.8. Avaliação do volume do glúten após forneamento .....	46
<b>2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	46
2.3.1. PRODUÇÃO ENZIMÁTICA E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA XILANASE .....	46
2.3.1.1. Efeito dos substratos na produção de enzimas .....	46
2.3.1.2. Curva de produção da xilanase, alfa-amilase e protease em fermentação sólida .....	47
2.3.1.3. pH ótimo e de estabilidade .....	49
2.3.1.4. Temperatura ótima e de estabilidade .....	50
2.3.2. APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO NO GLÚTEN .....	51
2.3.3. PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DA CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE .....	53
<b>2.4. CONCLUSÃO</b> .....	55
<b>2.5. REFERÊNCIAS</b> .....	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1.	Perfil da produção da xilanase pelo <i>T. aurantiacus</i> , sob FES em diferentes substratos .....	47
Figura 2.2.	Perfil da produção da alfa-amilase pelo <i>T. aurantiacus</i> , sob FES em diferentes substratos .....	48
Figura 2.3.	Perfil da produção da protease pelo <i>T. aurantiacus</i> , sob FES em diferentes substratos .....	49
Figura 2.4.	Efeito do pH sobre a atividade (A) e a estabilidade (B) da xilanase .....	50
Figura 2.5.	Efeito da temperatura sobre a atividade (A) e a estabilidade (B) da xilanase .....	51
Figura 2.6.	Efeito da protease do extrato enzimático no glúten .....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1.	Efeito de diferentes substratos sobre a produção enzimática, após 6 dias de incubação pelo fungo <i>T. aurantiacus</i> .....	46
Tabela 2.2.	Efeito dos diferentes extratos concentrados sobre as proteínas do glúten de trigo .....	52
Tabela 2.3.	Purificação parcial da xilanase produzida em FES a 50°C sobre sabugo de milho pelo <i>Thermoascus aurantiacus</i> CBMAI 756 .....	53
Tabela 2.4.	Purificação parcial da CGTase produzida por fermentação submersa a 35°C pela bactéria <i>Bacillus clausii</i> E16 .....	54

## 2.1. Introdução

As enzimas são amplamente usadas como uma ferramenta tecnológica para auxiliar vários processos na indústria de alimentos. As enzimas microbianas podem ser produzidas por fermentação sólida ou submersa. A fermentação em estado sólido (SSF) é um processo atrativo para a produção de enzimas, especialmente para culturas fungicas, porque apresenta muitas vantagens; como alta produtividade por volume de reação além do baixo custo de manutenção (PURKARTHOFFER; SINNER; STEINER, 1993). A SSF é definida como a fermentação que ocorre em sólidos na ausência (ou perto da ausência) de água livre, mas com umidade suficiente para suportar o crescimento e o metabolismo do microrganismo (PANDEY, 2003).

Recentemente, a indústria de panificação tem focado sua atenção na substituição de vários componentes químicos pelas enzimas. As enzimas de origem microbiana disponíveis para a aplicação em panificação incluem as: -amilases, proteases, glucoamilases, pentosanases e glucanases (JENNYLAND; BENJAMIN, 1996). Enzimas que hidrolisam polissacarídeos não-amiláceos, como as xilanases, direcionam a uma melhora das propriedades tecnológicas da massa, do volume específico dos pães e na textura do miolo (MARTINEZ-ANAYA; JIMENEZ 1997; COURTIN; GELDERS; DELCOUR, 2001; ROUAU; EL-HAYER; MOREAU, 2001).

Os principais componentes dos polissacarídeos não-amiláceos da farinha de trigo são as pentosanas, principalmente as arabinoxilanas (COURTIN; DELCOUR, 2002), as quais são o principal componente da hemicelulose e consiste de moléculas de xilose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999; LI et al, 2000). A xilanase é usada em panificação para hidrolisar as arabinoxilanas presentes na parede celular do endosperma da farinha de trigo (MARTINEZ-ANAYA; JIMENEZ, 1997). O efeito positivo da xilanase sobre a qualidade do pão pode ser atribuído à melhor distribuição da água para ambas: pentosana e glúten (HAROS; ROSELL; BENEDITO, 2002). A  $\alpha$ -amilase ataca aleatoriamente o amido hidrolisando as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 da molécula de amilose e amilopectina. Esta enzima é adicionada à formulação do pão para liberar açúcares fermentáveis, os quais contribuem indiretamente para a produção de dióxido de carbono (ATWELL, 2001).

As proteases hidrolisam as ligações peptídicas das proteínas (glúten) presentes na farinha de trigo. Se esta hidrólise ocorrer em baixa extensão, pode reduzir o tamanho do complexo glúten, facilitando a manuseio da massa (ATWELL, 2001).

O fungo *Thermoascus aurantiacus* é um bom produtor de xilanase (Da-Silva et al, 2005a), no entanto, ele também produz alta concentração de protease, como verificado por Merheb et al, (2007).

É amplamente conhecido que a composição do meio de cultura influencia o perfil de produção e a atividade enzimática em culturas microbianas. O objetivo deste trabalho foi a produção de um extrato enzimático com uma produção maximizada de xilanase e uma produção minimizada de protease e  $\alpha$ -amilase. Além disso, a ação deste extrato enzimático sobre o volume o glúten foi avaliada e as características físico-químicas da xilanase produzida no extrato selecionado foram determinadas.

## **2.2. Material e Métodos**

### **2.2.1. Material**

Farinha de trigo obtida da moagem de grãos duros, adequada para produção de pão, gentilmente doada pelo moinho Sete Irmãos (Uberlândia, Brasil) foi usada neste trabalho. Outros ingredientes para confecção dos pães foram obtidos do comércio local (São José do Rio Preto, Brasil).

As enzimas utilizadas neste estudo foram a xilanase produzida por meio de fermentação sólida pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 e a ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) produzida por meio de fermentação submersa pela bactéria *Bacillus clausii* E16, parcialmente purificadas. Os dois extratos enzimáticos eram livres das enzimas amilolíticas  $\alpha$ -amilase e glucoamilase.

Todos os outros reagentes utilizados foram puros para análise. Os resíduos agrícolas (meios de culturas) farelo de trigo, sabugo de milho e palha de milho foram obtidos de fazendas da região de São José do Rio Preto, Brasil.

### **2.2.2. Métodos**

#### **2.2.2.1. Microrganismos e condições de cultura**

O fungo, *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, que pertence ao banco de culturas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da Universidade Estadual Paulista (São José do Rio Preto, Brasil), foi inoculado em tubos teste com meio de cultura agar Sabouraud dextrose (Oxoid) e incubado a 50°C por 2 dias para seu crescimento completo. O micélio foi resuspendido em 100 mL de solução nutriente, contendo 0,1% (p/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  e  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e 10 mL desta suspensão micelial foi usada para inocular o meio de cultura. A fermentação em estado sólido (FES) foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de cada meio de cultura (farelo de trigo, sabugo de milho ou palha de milho) umedecidos com 10 mL de suspensão micelial, objetivando obter uma umidade inicial de 67%.

Após 6 dias (ou como indicado) de incubação a 50°C, o extrato enzimático bruto foi obtido pela adição de 40 mL de água destilada ao material fermentado, e os frascos foram mantidos sob agitação (100 rpm) por 30 minutos a temperatura ambiente. O material foi filtrado a vácuo utilizando papel Whatman nº 1 e centrifugado a 19.800g/10 minutos a 5°C para a obtenção do extrato enzimático bruto livre de sólidos. Os experimentos foram realizados em duplicata.

A bactéria, *Bacillus clausii* E16, que pertence ao banco de culturas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da Universidade Estadual Paulista (São José do Rio Preto, Brasil), foi inoculada em tubos teste com meio de cultura proposto por [Alves-Prado et al. \(2007\)](#) composto de 1,34% de amido solúvel (Synth), 0,49% de peptona (BioBrás), 0,59% de extrato de levedura (Oxoid), 0,1% de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Dinâmica), 0,02% de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Nuclear), 1,25% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Synth) (esterilizado separadamente e adicionado ao meio após resfriado), pH inicial 10,1 e incubados a 35°C por 48 horas para seu crescimento completo. A fermentação submersa foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL do meio de cultura e 1 mL do pré inoculo e incubados a 35°C por 48 horas sob agitação de 150 rpm. O extrato enzimático bruto foi obtido pela centrifugação a 10.000g/20 minutos a 4°C e o sobrenadante contendo a CGTase foi recuperado.

#### **2.2.2.2. Ensaios enzimáticos**

A atividade da xilanase e -amilase do extrato enzimático foram determinadas pela incubação de 0,1 mL da solução enzimática apropriadamente diluída com 0,9 mL de solução contendo 0,5% dos respectivos substratos, xilana birchwood (Sigma, USA), e amido solúvel (Mallinckrodt, France), em tampão acetato 0,1 M, pH 5,5. Após a incubação a 60°C por 10 min. 1 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS) foi adicionado para completar a reação. Os açúcares redutores liberados da reação foram determinados de acordo com [Miller \(1959\)](#). Os controles foram preparados adicionando o extrato enzimático posteriormente ao ácido dinitrosalicílico (DNS). Uma Unidade Internacional (IU) de atividade enzimática foi definida como 1 µmol de equivalente de xilose (xilanase) ou glicose (-amilase) liberada por minuto dentro das condições de ensaio mencionadas acima, pelo uso de uma curva padrão de xilose ou de glicose.

A atividade da glucoamilase (GA) do extrato enzimático foi determinada pelo método enzimático da peroxidase/glicose-oxidase descrito por [Bergmeyer; Bernt \(1974\)](#) com modificações. A mistura de reação foi preparada com 0,4 mL de solução de amido solúvel 0,5% (Mallinckrodt) em tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 4,5 e 0,1 mL da solução enzimática apropriadamente diluída. Após a mistura permanecer por 10 min. a 50°C, as amostras foram resfriadas em banho de gelo. Uma alíquota de 0,2 mL foi retirada e misturada com 0,3 mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0. Um mL de reagente de glicose oxidase foi adicionado e a mistura

foi incubada por 1 hora a 37°C. Após esse tempo a absorbância foi medida em 500 nm. Uma unidade de GA foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1  $\mu$ mol de glicose/minuto dentro das condições de ensaio e a atividade foi expressa como U/mL.

A atividade da protease do extrato enzimático foi determinada de acordo com [Kembhavi; Kulkarni; Panti \(1993\)](#), com modificações. A mistura de reação foi preparada com 0,4 mL de caseína 0,5% (p/v) (Sigma) em água destilada, 0,4 mL de tampão acetato 0,2 M, pH 5,5 e 0,2 mL da solução enzimática apropriadamente diluída. A mistura foi incubada a 60°C e a reação foi interrompida após 30 minutos com 1 mL de ácido tricloracético 10% (TCA). Os tubos contendo a mistura de reação foram centrifugados a 2300g/5 minutos e a absorbância do sobrenadante foi medida a 280 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi arbitrariamente definida como a quantidade de enzima requerida para causar um aumento de 0,1 na absorbância a 280 nm, dentro das condições de ensaio.

A atividade da ciclodextrina glicosiltransferase no extrato enzimático foi determinada pelo método proposto por [Mäkelä et al. \(1988\)](#), modificado por [Alves-Prado et al. \(2007\)](#), pela incubação de 0,1 mL da solução enzimática apropriadamente diluída com 0,8 mL de solução de maltodextrina (Aldrich) 1,0% em tampão acetato 0,1 M, pH 5,5. Após a incubação a 55°C por 10 minutos, 4 mL de carbonato de sódio 0,25 M foi adicionado para parar a reação. Posteriormente 0,1 mL de fenolftaleína 1 mM foi adicionada nos tubos de reação. Os controles foram preparados pela adição da solução enzimática antes da leitura espectrofotométrica a 550 nm. Uma Unidade Internacional (IU) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ mol de  $\beta$ -ciclodextrina, por minuto. A curva padrão foi plotada com concentrações de  $\beta$ -ciclodextrina.

#### **2.2.2.3. Determinação de proteína dos extratos enzimáticos**

O conteúdo de proteína foi determinado seguindo o método de [Lowry et al. \(1951\)](#), usando soro albumina bovina como padrão.

#### **2.2.2.4. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da xilanase**

A determinação do pH ótimo da xilanase foi realizada a 60°C, em diferentes valores de pH, usando as seguintes soluções tampão (0,1 M): acetato de sódio (pH 3,0-5,5), MES (pH 6,0-7,0), TAPS (pH 7,5-8,5) e Glicina-NaOH (9,0-11,0). A temperatura ótima foi determinada pela incubação da mistura de reação em diferentes temperaturas que variaram de 40°C a 85°C e o ensaio da atividade da xilanase foi realizada no pH e temperatura ótima.

#### 2.2.2.5. Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade da xilanase

Para determinar a estabilidade da xilanase ao pH, a enzima foi adicionada numa concentração de (1:29) nas seguintes soluções tampão (0,1 M): acetato de sódio (pH 3,0-5,5), MES (pH 6,0-7,0), TAPS (pH 7,5-8,5) e Glicina-NaOH (9,0-11,0), e mantida a 25°C por 24 horas. Após esse período, a atividade xilanolítica residual foi determinada dentro das condições ótimas de pH e temperatura (5,0 e 75°C, respectivamente). A estabilidade térmica foi determinada pela incubação da enzima em diferentes temperaturas que variaram de 40°C a 85°C por 1 hora no pH 5,0. Após esse período a atividade xilanolítica residual foi determinada dentro das condições ótimas de pH e temperatura (5,0 e 75°C, respectivamente).

#### 2.2.2.6. Concentração dos extratos enzimáticos

Para aplicação do extrato enzimático produzido pelo *T. aurantiacus* no glúten da farinha de trigo, o extrato (300 mL) foi concentrado com etanol 75% a 4°C por 12 horas. O precipitado foi separado pela centrifugação a 13.700 *g*/20 minutos, e então dissolvido em uma pequena quantidade (1 mL) de água destilada.

O extrato enzimático produzido pelo *Bacillus clausii* E16 foi concentrado por ultrafiltração pelo sistema Benchtop® (Quix Stand) em coluna de 10,000 NMWC (Amersham Biosciences). A enzima CGTase desnatura (perde atividade) quando precipitada em álcool, por este motivo, esta foi parcialmente purificada por ultra filtração

#### 2.2.2.7. Obtenção do glúten e efeito da protease

A massa foi elaborada com farinha de trigo (100 g) e água (50 mL). Estes ingredientes foram misturados manualmente por 5 min. e a massa ficou em repouso por 30 min. para a formação do glúten a partir da glutenina e da gliadina. Posteriormente a massa foi lavada em água corrente para a remoção do amido de acordo com o [método 38-10 da Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists \(AACC\) \(2000\)](#). Fermento biológico (2%) e açúcar (3%) foram adicionados ao glúten e então 1/4 do glúten foi separado baseado no seu peso. O restante do glúten (3/4) foram separados em três partes iguais e cada uma recebeu 60U de xilanase (extrato bruto). Após 50 minutos de repouso, as amostras de gluten foram fornecidas por 20 minutos a 150°C. O experimento foi realizado em duplicata.

### 2.2.2.8. Avaliação do volume do glúten após forneamento

O volume do glúten foi determinado 1 hora após o término do forneamento, de acordo com o [método 10-05 da. AACC \(2000\)](#) O volume específico (mL/g) foi determinado pela divisão do volume (mL) pelo peso (g). Os experimentos foram realizados em duplicata.

## 2.3. Resultados e discussão

### 2.3.1. Produção enzimática e caracterização físico-química da xilanase

#### 2.3.1.1. Efeito dos substratos na produção de enzimas

O primeiro experimento foi realizado para determinar qual seria o substrato mais adequado para o fungo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 se desenvolver e produzir uma grande quantidade de xilanase e uma pequena quantidade de proteases e enzimas que degradam o amido, por meio de fermentação em estado sólido (FES).

A **Tabela 2.1** apresenta os resultados para a produção de xilanase, protease, -amilase e glucoamilase usando diferentes resíduos como substratos. Os substratos farelo de trigo, sabugo de milho e palha de milho foram umedecido com solução nutriente para se obter uma umidade inicial de 67%.

O fungo *T. aurantiacus* produziu xilanase em todos os substratos estudados, entretanto, a produção em sabugo de milho foi mais pronunciada (130 U/mL) após 6 dias de fermentação. A alta produção de xilanase por este fungo já havia sido relatada por [Da-Silva et al. \(2005a\)](#) usando substratos umedecidos com água.

**Tabela 2.1.** Efeito de diferentes substratos sobre a produção enzimática, após 6 dias de incubação pelo fungo *T. aurantiacus*.

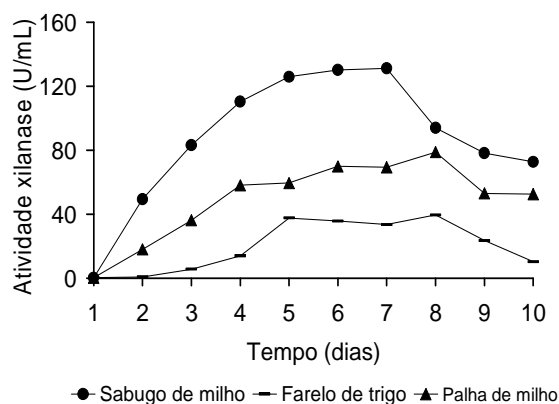
Substrato	Xilanase (U/mL)	Protease (U/mL)	-Amilase (U/mL)	Glucoamilase (U/mL)
Farelo de trigo	36	46	6	<1
Sabugo de milho	130	15	<1	<1
Palha de milho	70	37	6	<1

A produção de protease foi maior em presença de farelo de trigo, seguido da palha e do sabugo de milho. Sendo o farelo de trigo um substrato rico em proteína, entre outros componentes, já se esperava uma boa produção de protease em relação aos demais substratos estudados.

As produções de  $\alpha$ -amilase e glucoamilase foram pequenas em relação às outras enzimas. Isso pode ser explicado pelo fato de que os substratos utilizados são principalmente, fontes de celulose e hemicelulose. A xilana é a principal hemicelulose presente nos materiais lignocelulósicos e sua hidrólise requer a ação da xilanase (BILGRAMI; PANDEY, 1992). Os níveis de produção de enzimas em diferentes substratos são determinados por muitos fatores envolvendo o tipo de processo fermentativo, a presença de ativadores e inibidores, a área de superfície do substrato, a difusão de catabólicos, o pré-tratamento, e o conteúdo e composição de açúcares destes substratos (DAMASO; ANDRADE; PEREIRA-JR, 2000).

### 2.3.1.2. Curva de produção da xilanase, $\alpha$ -amilase e protease em fermentação sólida.

A **Figura 2.1** apresenta o perfil de produção da xilanase pelo fungo *T. aurantiacus* durante 10 dias de fermentação utilizando como substrato farelo de trigo, sabugo e palha de milho.



**Figura 2.1.** Perfil da produção da xilanase pelo *T. aurantiacus*, sob FES em diferentes substratos.

A produção máxima de xilanase nos três substratos mencionados acima ocorreu a partir do 5º dia de fermentação. Outros autores relataram que os microorganismos *T. aurantiacus* e *Arthrobacter sp.* utilizando como substrato farelo de trigo produziram picos de xilanase em menor tempo (DA-SILVA et al., 2005a; KHANDEPARKAR; BHOSLE, 2006). Experimento semelhante realizado por Shah; Shah; Madamwar, (2006), trabalhando com *Aspergillus foetidus* MTCC 4898, cultivado por meio de fermentação sólida e usando como substrato sabugo de milho, relataram pico de produção antes do quarto dia de fermentação. Todavia, sabe-se que a comparação quantitativa de atividades enzimáticas relatadas na literatura não é conclusiva tendo em vista diferenças metodológicas, condições da linhagem e outros parâmetros utilizados.

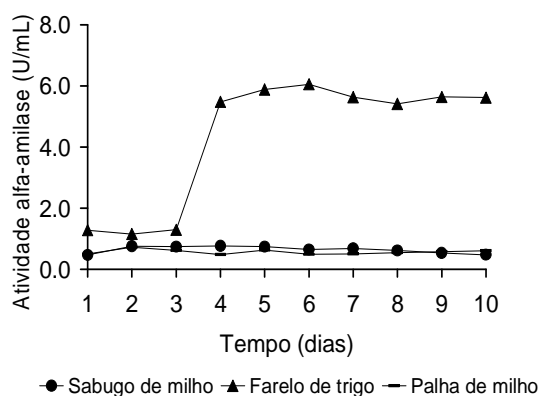
Dos substratos utilizados neste estudo, o sabugo de milho foi o mais efetivo para produção da xilanase (126 U/mL) no quinto dia de fermentação. A partir do sétimo dia de

fermentação houve uma queda pronunciada na produção desta enzima nos três substratos mencionados acima. [Shah; Shah; Madamwar \(2006\)](#), trabalhando com *Aspegillus foetidus* MTCC 4898, cultivado também por meio de fermentação sólida usando como substrato sabugo de milho, observaram uma atividade de xilanase de 307 U/mL no quarto dia de fermentação.

Alguns autores estudando a produção de xilanase em fermentação submersa obtiveram atividades de 480 U/mL e 280 U/mL no quarto e sexto dia (96 e 144h, respectivamente), de cultivo com *T. lanuginosus* IOC-4145 e *Aspergillus nidulans*, respectivamente, usando como substrato sabugo de milho ([DAMASO; ANDRADE; PEREIRA-JR, 2002](#); [REIS; COSTA; PERALTA, 2003](#)).

Em relação ao crescimento do *T. aurantiacus* sobre os diferentes substratos, observa-se que nem sempre um bom crescimento microbiano corresponde a uma maior produção enzimática, uma vez que o farelo de trigo proporcionou o melhor crescimento do microrganismo (observação visual), e, no entanto foi o que resultou na menor produção de xilanase.

A **Figura 2.2** apresenta o perfil de produção da  $\alpha$ -amilase pelo fungo *T. aurantiacus* durante 10 dias de fermentação.



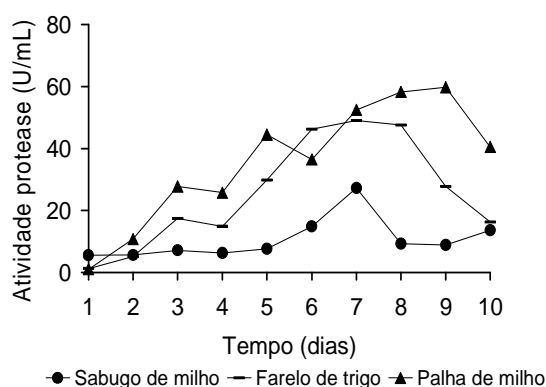
**Figura 2.2.** Perfil da produção da alfa-amilase pelo *T. aurantiacus*, sob FES em diferentes substratos.

Apenas o substrato farelo de trigo proporcionou ao *T. aurantiacus* uma pequena produção de  $\alpha$ -amilase, a partir do quarto dia de fermentação (5,48 U/mL), não havendo alterações até o final.

Dentre os substratos estudados, o farelo de trigo é o que apresenta maior teor de amido, o que pode ter induzido a produção de  $\alpha$ -amilases. Para outros fungos, trabalhos da literatura relatam atividades para  $\alpha$ -amilase maior que a encontrada no presente estudo com *Thermoascus aurantiacus*. Assim, a produção de  $\alpha$ -amilase por *Thermomyces lanuginosus* foi de 106 U/mL em farelo de trigo no 5º dia de fermentação ([KUNAMNENI; PERMAUL; SINGH, 2005](#)).

Isso é uma característica importante para o uso em processos de panificação, já que o excesso de  $\alpha$ -amilase pode causar excesso de açúcares redutores e produzir o escurecimento excessivo da casca, além de prejudicar a textura do miolo (pegajoso) e o volume do pão.

Na **Figura 2.3** tem-se o perfil da produção de protease pelo *T. aurantiacus* onde se observa que os meios contendo farelo de trigo e palha de milho apresentaram maiores atividades proteolíticas, 48 U/mL e 58 U/mL, no sétimo e nono dia (168 e 216h), respectivamente. A produção de protease foi menor quando o fungo cresceu no sabugo de milho, o que novamente é bom para panificação, pois o excesso de protease pode desestabilizar o complexo de glúten responsável pela retenção de gás nos produtos fermentados.



**Figura 2.3.** Perfil da produção da protease pelo *T. aurantiacus*, sob FES em diferentes substratos.

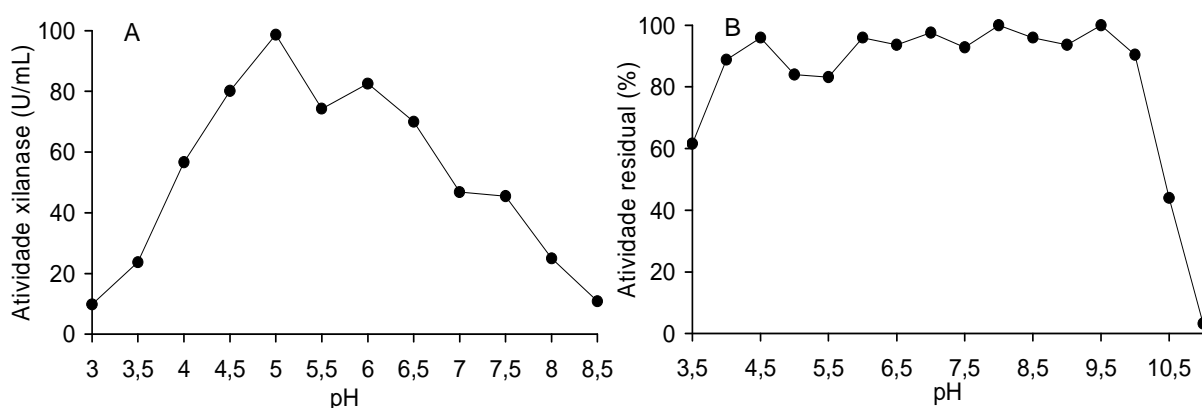
Investigações da produção de protease por culturas de fungo têm mostrado que existe uma variação na quantidade de enzima produzida em função do meio usado ([ANDRADE et al., 2002](#)), significando que a adaptação metabólica do microrganismo depende do tipo de substrato empregado na fermentação. Isto foi confirmado neste trabalho, onde a atividade proteolítica do *T. aurantiacus* cultivado em farelo de trigo, sabugo e palha de milho foram de 49, 27 e 53 U/mL de protease, respectivamente nos seus picos de produção.

Outro estudo relatou uma atividade proteolítica de 248 U/mL de protease utilizando o mesmo microrganismo, porém utilizando caseína como indutor no meio de farelo de trigo para o crescimento ([MERHEB et al., 2006](#)). A produção de protease (43 U/mL) por *Penicillium* sp. em semente de soja também foi maior que a obtida com sabugo de milho neste trabalho ([GERMANO et al., 2002](#)).

### 2.3.1.3. pH ótimo e de estabilidade

O efeito do pH na atividade da xilanase, investigado na faixa de pH 3,0 a 8,5, e o efeito do pH na estabilidade da xilanase, investigado na faixa de pH 3,5 a 11,0, estão apresentados na **Figura 2.4**.

A xilanase apresentou uma atividade ótima no pH 5.0 (**Figura 2.4 A**). Este pH ótimo foi o mesmo relatado por [Gomes; Gomes; Steiner \(1994\)](#) para o fungo *T. aurantiacus* em fermentação submersa e por [Da-Silva et al. \(2005\)](#) em fermentação em estado sólido. Trabalhos com outros fungos *Paecilomyces thermophila*, *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 e *Acrophialophora nainiana* relatam um pH ótimo para xilanase maior que o encontrado neste trabalho, pH 7.0 ([LI et al., 2006](#); [LI et al., 2005](#); [SALLES et al., 2002](#)).



**Figura 2.4.** Efeito do pH sobre a atividade (A) e a estabilidade (B) da xilanase. Tampão acetato (pH 3,0 a 5,5), MES (pH 6,0 a 7,0), TAPS (pH 7,5 a 8,5) e Glicina -NaOH (9,0 a 11,0).

Após 24 h de incubação a 25°C, a enzima reteve cerca de 90% da atividade enzimática inicial (**Figura 2.4 B**) na faixa de pH 4,0 a 10,0. Em pH 3,5 e pH 10,5 a enzima reteve 62% e 44% da atividade inicial, respectivamente. Trabalhos anteriores realizados com fungos termofílicos *Paecilomyces thermophila* e *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54, mostraram uma faixa de estabilidade para xilanase entre pH 6,0 a 11,0 e pH 6,5 a 10,0, respectivamente ([LI et al., 2006](#); [LI et al., 2005](#)).

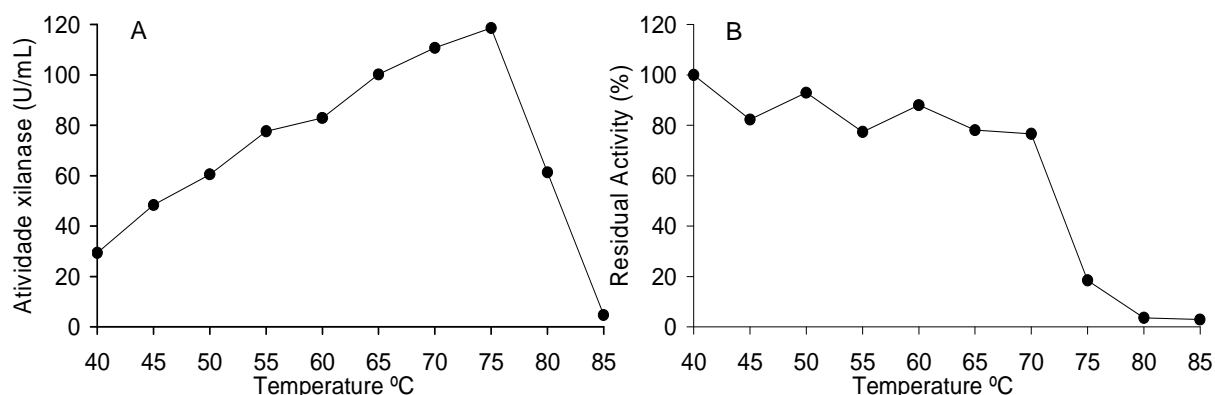
#### 2.3.1.4. Temperatura ótima e de estabilidade

O efeito da temperatura sobre a atividade e a estabilidade da xilanase foi investigado na faixa de temperatura de 40 a 85°C, e estão representados na **Figura 2.5**.

O efeito da temperatura na atividade da xilanase foi determinado em pH 5,0 tampão acetato 0,1 M e nas temperaturas, entre 40°C e 85°C. A atividade ótima da xilanase foi observada a temperatura de 75°C (**Figura 2.5 A**). Esta temperatura ótima foi igual à relatada por [Da-Silva et al. \(2005a\)](#), mas foi menor que a relatada por [Gomes; Gomes; Steiner \(1994\)](#) para o *T. aurantiacus*, que foi de 80°C.

Outros fungos termofílicos *Paecilomyces thermophila* e *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 também apresentaram uma temperatura ótima para xilanase de 75°C ([LI et al., 2006](#); [LI et al., 2005](#)). Quando a atividade foi determinada a 50°C, a qual é rotineiramente usada para

ensaios de atividades de fungos mesofílicos, a atividade da xilanase foi de 51% do valor obtido na temperatura de 75°C.



**Figura 2.5.** Efeito da temperatura sobre a atividade (A) e a estabilidade (B) da xilanase.

A estabilidade da xilanase (**Figura 2.5 B**) foi mantida em uma ampla faixa de temperatura, exibindo em torno de 80% da atividade total entre as temperaturas de 40°C a 70°C, começando a sofrer forte desnaturação a partir de 70°C. Na temperatura de 75°C a enzima reteve apenas 18% da sua atividade máxima. Esta temperatura de estabilidade foi maior do que a relatada por [Da-Silva et al. \(2005a\)](#) para o mesmo microrganismo onde a xilanase foi estável até 60°C e a 70°C reteve apenas 22% da atividade total.

Outros pesquisadores trabalhando com caracterização físico-química de xilanase isolada de vários fungos termofílicos observaram temperaturas de estabilidade entre 50°C e 65°C ([KHANDEPARKAR; BHOSLE, 2006](#); [DAMASO; ANDRADE; PEREIRA-JR, 2002](#); [SANDRIM et al., 2005](#); [REIS; COSTA; PERALTA, 2003](#); [LI et al., 2005](#)).

Nossos resultados indicam que a xilanase produzida por *T. aurantiacus* CBMAI 756 tem potencial para aplicação industrial em processos que requerem temperaturas elevadas, todavia a desnaturação acima de 70°C indica que a enzima será inativada após a temperatura de forneamento tiver inativado a levedura. Isto garante que não haverá acúmulo de produto de hidrólise após a morte térmica da levedura. As enzimas termoestáveis apresentam vantagens por poderem ser mais facilmente estocadas, manipuladas e transportadas sem problemas de perdas de atividades.

### 2.3.2. Aplicação do extrato enzimático no glúten

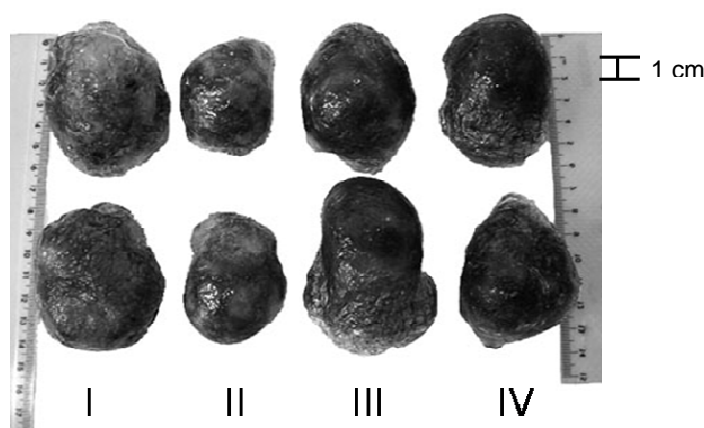
A **Tabela 2.2** apresenta o efeito dos diferentes extratos enzimáticos sobre as proteínas do glúten do trigo. Os extratos parcialmente purificados foram padronizados pelo nível de xilanase (60 U/mL). A integridade do glúten é importante para preservar o volume e a textura

do pão. A presença elevada de protease no extrato enzimático pode prejudicar a qualidade do pão.

O extrato enzimático obtido por meio da fermentação em sabugo de milho resultou em glúten com um volume específico maior (**Figura 2.6**) do que o controle (não tratado com extrato enzimático). A atividade proteolítica deve ser mínima ou ausente quando um tratamento enzimático for realizado em produtos de panificação, uma vez que essa enzima atua na degradação do glúten. O extrato enzimático obtido da fermentação com sabugo de milho apresentou a menor atividade proteolítica entre os extratos estudados e esse resultado ficou demonstrado pela integridade do glúten em relação aos demais extratos empregados.

**Tabela 2.2.** Efeito dos diferentes extratos enzimáticos concentrados sobre as proteínas do glúten de trigo.

<i>Glúten</i>	Volume específico (mL/g)	Porcentagem de alteração do volume	Protease (U/mL)	Xilanase (U/mL)
<i>I- Controle</i>	9,7		-	-
<i>II- Farelo de trigo</i>	4,6	(-53%)	40	60
<i>III- Sabugo de milho</i>	10	(+3,1%)	4	60
<i>IV- Palha de milho</i>	6,8	(-29,9%)	50	60



**Figura 2.6.** Efeito da protease do extrato enzimático no glúten. Ordem da esquerda para direita (I- controle, II- farelo de trigo, III- sabugo de milho e IV- palha de milho).

As proteínas do glúten, gliadina e glutenina, apresentam uma funcionalidade importantíssima em produtos de panificação, pois afetam as características de mistura, extensibilidade e elasticidade da massa. As diferenças na qualidade e quantidade das proteínas do glúten têm importância crucial no processo de panificação. A rede de glúten é responsável pela estruturação da massa por reter o CO<sub>2</sub> produzido pelo metabolismo das leveduras que fermentam os açúcares presentes na massa (HE; HOSENEY, 1991; JAN; ELLIS;

SCHOFIELD, 1995). Por isso a manutenção da integridade do glúten é fundamental para o crescimento da massa.

Experimentos realizados usando uma mistura de farinha de trigo e glúten comercial mostraram um aumento significativo no volume e altura do pão (BORLA et al., 2004). Outros estudos mostram que a alta atividade proteolítica da farinha de trigo afeta negativamente o processo de panificação pela progressiva diminuição da resistência do glúten (KARA; SIVRI; KÖKSEL, 2004).

Deste modo o cultivo do fungo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 em sabugo de milho resultou num extrato enzimático adequado para panificação. Apresentou uma excelente atividade xilanolítica e baixas atividades proteolíticas e amilolíticas, perfil enzimático adequado no coquetel a ser empregado no processo de panificação.

Antes da aplicação da xilanase na farinha para o estudo das características reológicas e da aplicação no pão para análise do efeito da enzima na qualidade e no processo de envelhecimento do pão, o extrato bruto foi parcialmente purificado.

O extrato enzimático bruto obtido por meio da fermentação sólida em sabugo de milho foi submetido à precipitação com álcool etílico (75%), com 80,7% de xilanase recuperada. Os dados da purificação parcial da xilanase estão resumidos na **Tabela 2.3**.

**Tabela 2.3.** Purificação parcial da xilanase produzida em FES a 50°C sobre sabugo de milho pelo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756.

	Volume (mL)	Xilanase total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Produção (%)	Fator Purificação
<i>Extrato bruto</i>	300	53.700	338,4	158,7	100,0	1,0
<i>Precipitado álcool etílico (75%)</i>	4,2	10.366	18,9	547,3	80,7	3,5

### 2.3.3. Produção e purificação parcial da ciclodextrina glicosiltransferase

Microrganismos alcalofílicos são seres vivos que apresentam um bom crescimento e desenvolvimento metabólico em pH elevado, acima de 9,0 como o *Bacillus clausii* E16.

A produção de CGTase pela bactéria alcalofílica *Bacillus clausii* E16 após 48 horas de incubação a 35°C foi de 2,78 U/mL, usando como fonte de carbono amido solúvel. Após a concentração do extrato bruto por ultrafiltração, obtivemos uma atividade de 25,6 U/mL.

Trabalhando com o mesmo meio de cultura otimizado Alves-Prado et al. (2007) conseguiram uma atividade de CGTase de 5,9 U/mL após 48 horas de fermentação, usando o mesmo microrganismo.

Da-Silva et al. (2005b) trabalhando no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada desta Universidade realizaram a purificação e caracterização da CGTase produzida

pelo *Bacillus clausii* E16 que apresentou massa molecular estimada em 75 kDa e uma atividade ótima na temperatura de 55°C e no pH 6,0, o que sugere que esta CGTase necessita de um pH neutro para realizar a reação de ciclização.

Bonilha et al. (2006) otimizando a produção de CGTase a partir da bactéria *Bacillus licheniformis* usando como fontes de carbono amido de batata, amido de mandioca e amilopectina conseguiram uma atividade de 0,16 U/mL, 0,10 U/mL e 0,08 U/mL, para os respectivos substratos citados acima.

O extrato enzimático bruto obtido por meio da fermentação submersa foi submetido à ultrafiltração, com 94,2% de CGTase recuperada. Os dados da purificação parcial da CGTase estão resumidos na **Tabela 2.4**.

**Tabela 2.4.** Purificação parcial da CGTase produzida por fermentação submersa a 35°C pela bactéria *Bacillus clausii* E16.

	Volume (mL)	CGTase total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Produção (%)	Fator Purificação
<i>Extrato bruto</i>	1300	3.614	4.076	0,88	100,0	1,0
<i>Ultrafiltração</i>	135	3.407	527	6,5	94,2	6,6

O extrato bruto foi concentrado 9,6 vezes por ultrafiltração em membrana de 10 kDa, apresentando uma atividade específica de 6,5 U/mg.

Estudos de produção e purificação parcial de CGTase pelos microrganismos *Klebsiella pneumoniae* AS-22 e *Bacillus firmus*, cujos extratos enzimáticos foram submetidos a ultrafiltração em membranas de 25 e 30 kDa, apresentaram atividades específicas de 13 U/mg e 8,8 U/mg, respectivamente. Esses valores são maiores que os encontrados neste estudo. A taxa de recuperação da CGTase nos extratos concentrados foi semelhante a encontrada neste trabalho 93% e 91,5%, respectivamente (GAWANDE; PATKAR, 2001; SAVERGAVE et al., 2008).

Outros microrganismos alcalofílicos como *Bacillus sp.* CGII e *Bacillus sp.* G1 produzidos usando como fonte de carbono amido de batata (1,5%) e dextrina apresentaram atividades específicas de CGTase de 12,0 U/mg e 42,16 U/mg, respectivamente. Nestes trabalhos os extratos foram parcialmente purificados com sulfato de amônio 70%, sendo recuperado apenas 39,53% da CGTase no extrato produzido pelo microrganismo *Bacillus sp.* G1 (FREITAS et al., 2004; SIANA et al., 2005).

A atividade amilolítica observada no extrato parcialmente purificado é realmente devido a ação da CGTase. Dosagens enzimáticas para verificar a presença de  $\alpha$ -amilase e glucoamilase foram realizadas e estas enzimas não estavam presentes neste extrato.

## 2.4. Conclusão

O fungo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 exibiu uma variação no perfil enzimático de acordo com cada substrato usado no seu cultivo. O substrato que resultou no melhor perfil enzimático para o uso em panificação foi o sabugo de milho, porque esse extrato enzimático exibiu alta atividade xilanolítica e baixa atividade amilolítica e proteolítica. Este perfil é adequado para experimentos de panificação, porque implica em baixa degradação de amido e do glúten e alta solubilidade da xilana, contribuindo para a qualidade do pão. As características físico-químicas do extrato bruto da xilanase produzido pelo *Thermoascus aurantiacus* em sabugo de milho, revelou que a enzima apresenta um pH ótimo de 5,0, perto do pH da massa do pão. A temperatura ótima foi alta, mas a enzima foi desnaturada em pH acima de 70°C e também permaneceu estável em uma ampla faixa de pH (4,0-10,0).

O extrato produzido pela bactéria *Bacillus clausii* E16 apresentava a enzima de interesse, CGTase, mas estava livre das enzimas amilolíticas  $\alpha$ -amilase e glucoamilase.

## 2.5. References

AACC – **Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists**. 7. ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemistry, v. 3, 2000.

ALVES-PRADO, H. F; HILÁRIO, E; GOMES, E; DA SILVA, R. Optimization of cyclodextrin glucanotransferase production from *Bacillus clausii* E16 in submerged fermentation using response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.137, p. 189-196, 2007.

ANDRADE, V. S; SARUBBLO, L. A; FUKUSHIMA, K; MIYAJI, M; NISHIMURA, K; TAKAKI, G. M. C. Production of extracellular protease by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source/substrate. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 33, p. 27-40, 2006.

ATWELL, W. A. **Wheat flour**. St. Paul: Eagan Press, 2001.

BERGMEYER, H. U; BERNT, E. Determination of glucose with oxidase and peroxidase. IN: BERGMEYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis**. New York: Verlag – Chimie-Academic Press, v. 3, p. 1205-1215, 1974.

BILGRAMI, K. S; PANDEY, A. K. Industry and fermentation in introduction to Biotechnology. **E.S.K. Jain**, p. 149-165, 1992.

BONILHA, P. R. M; MENOCCI, V; GOULART, A. J; POLIZELI, M. L. T. M; MONTI, R. Cyclodextrin glycosyltransferase from *bacillus licheniformis*: optimization of production and its properties. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 317-323, 2006.

BORLA, P. B; MOTTA, E. L; SAIZ, A. I. FRITZ, R. Quality parameters and baking performance of commercial gluten flours. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie-Food Science and Technology**, v. 37, p. 723-729, 2004.

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

- COURTIN, C. M; GELDERS, G. G; DELCOUR, J. A. The use of two endoxylanases with different substrate selectivity provides insight into the functionality of arabinoxylans in wheat flour breadmaking. **Cereal Chemistry**, v. 78, p. 564–571, 2001.
- DAMASO, M. C. T; ANDRADE, C. M. M. C; PEREIRA-JR, N. Use of corncob for endoxylanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 84-6, p. 821-834, 2000.
- DAMASO, M. C. T; ANDRADE, C. M. M. C; PEREIRA-JR, N. Production and properties of cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 33, p. 333-338, 2002.
- DA-SILVA, R; LAGO, E. S; MERHEB, C. W; MACCHIONE, M. M; PARK, Y. K; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase on solid-state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 235-241, 2005a.
- DA-SILVA, R; ALVES-PRADO, H. F; GOMES, E; ROSA, J.C; GREENE, L. J. Purification and characterization of a new CGTase from an alkaliphilic *Bacillus clausii* E16. **Journal of Biotechnology**, v. 118, p. S60-S60, 2005b.
- FREITAS, T. L; MONTI, R; CONTIERO, J. Production of CGTase by a *Bacillus alkalophilic* CGII strain isolated from wastewater of a manioc flour industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 255-260, 2004
- GAWANDE, B. N; PATKAR, A. Y. Purification and properties of a novel raw starch degrading-cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS- 22. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28,p. 735-743, 2001.
- GERMANO, S; PANDEY, A; OSAKU, C. A; ROCHA, S. N; SOCCOL, C. R. Characterization and stability of protease from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 246-251, 2003.
- GOMES, D. J; GOMES, J; STEINER, W. Production of high thermostable xylanase by a wild strain of thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and partial characterization of the enzymes. **Journal Biotechnology**, v. 37, p. 11-22, 1994.
- HAROS, M; ROSELL, C. M; BENEDITO, C. Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling. **European Food Research and Technology**, v. 215, p. 425-430, 2002.
- HE, H; HOSSENEY, R. C. Differences in gas retention, protein solubility and rheological properties between flours of different baking quality. **Cereal Chemistry**, v. 68, p. 526-530, 1991.
- JAN, Z; ELLIS, P. R; SCHOFIELD, J. D. Mini review: Gas cell stabilization and gas retention in wheat bread. **Journal of Cereal Science**, v. 21, p. 215-230, 1995.
- JENNYLAND J, BENJAMIN SK. Application of enzymes in food processing. **Critical Review Food Science Nutrition**, v. 36, p. 437-463, 1996.
- KARA, M; SIVRI, D; KÖKSEL, H. Effects of high protease-activity flours and commercial proteases on cookie quality. **Food Research International**, v. 38, p. 479-486, 2005.
- KEMBHAVI, A. A; KULKARNI, A; PANTI, A. Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM N° 64. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 38, p. 83-92, 1993.
- KHANDEPARKAR, R. D. S; BHOSLE, N. B. Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 732-742, 2006.
- KULKARNI, N; SHENDYE, A; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 411-456, 1999.

- KUNAMNENI, A; PERMAUL, K; SINGH, S. Amylase production in solid-state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 168-171, 2005.
- LI, K; AZADI, P; COLLINS, R; TOLAN, J; KIM, J; ERIKSSON, K. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 27, p. 89-94, 2000.
- LI, L; TIAN, H; CHENG, Y; JIANG, Z; YANG, S. Purification and characterization of a thermostable cellulase-free xylanase from the newly isolated *Paecilomyces thermophila*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 780-787, 2006.
- LI, X. T; JIANG, Z. Q; LI, L. T; YANG, S. Q; FENG, W. Y; FAN, J. Y; KUSAKABE, I. Characterization of a cellulase-free, neutral xylanase from *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1370-1379, 2005.
- LOWRY, O. H; ROSENBROUGH, N. H; FARR, A. L; RANDALL, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MÄKELÄ, M. J; KORPELA, T. K; PUUSTO, J; LAAKSO, S. V. Nonchromatographic cyclodextrin: evaluation of sensitivity, and conversion mixture applications. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 36, p. 83-88, 1988.
- MARTINEZ-ANAYA, M. A; JIMÉNEZ, T. Functionality of enzymes that hydrolyse starch and non-starch polysaccharide in breadmaking. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A-Food Research Technology**, v. 205, p. 209-214, 1997.
- MERHEB, C. W; CABRAL, H; GOMES, E; DA-SILVA, R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**, v. 104, p. 127-131, 2006.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- PANDEY, A; SELVAKUMAR, P; SOCCOOL; C. R; NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 49-162, 1999.
- Pandey, A. Solid-state fermentation. **Journal Engineering Biochemistry**, v. 13, p. 81-84, 2003.
- PURKARTHOFFER H, SINNER M, STEINER W. Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: optimization of production in submerged and solid-state culture. **Enzyme Microbial Technology**, v. 15, p. 677-682, 1993.
- REIS, S; COSTA, M. A. F; PERALTA, R. M. Xylanase production by a wild strain of *Aspergillus nidulans*. **Acta Scientiarum: Biological Science**, v. 25, p. 221-225, 2003.
- ROUAU, X; EL-HAYEK, M. L; MOREAU, D. Effect of an enzyme preparation containing pentosanases on the bread-making quality of flours in relation to change in pentosan properties. **Journal of Cereal Science**, v. 78, p. 564-571, 2001.
- SALLES, B. C; CUNHA, R. B; FONTES, W; SOUSA, M. V; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*. **Journal Biotechnology**, v. 81, p. 199-204, 2000.
- SANDRIM, V. C; RIZZATTI, A. C. S; TERENCE, H. F; JORGE, J. A; MILAGRES, A. M. F; POLOZELI, M. T. M. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for Kraft pulp bleaching. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1823-1828, 2005.
- SAVERGAVE, L. S; DHULE, S. S; JOGDAND, V. V; NENE, S. N; GADRE, R. V. Production and single step purification of cyclodextrin glycosyltransferase from alkalophilic *Bacillus firmus* by ion exchange chromatography. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 510-515, 2008.

SHAH, A. R; SHAH, R. K; MADAMWAR, D. Improvement of the quality of whole wheat bread by supplementation of xylanase from *Aspergillus foetidus*. **Bioresouce Technology**, v. 97, p. 2047-2053, 2006.

SIANA, H. K; SAIDB, M; HASSANB, O; KAMARUDDINC, K; ISMAILA, A. F; RAHMANA, R. A; MAHMOODA, N. A. N; ILLIASA, R. M. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus sp.* G1. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1101-1111, 2005.

CAPÍTULO III  
APLICAÇÃO DE XILANASE NA PRODUÇÃO DE PÃES

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	61
LISTA DE TABELAS .....	62
3.1. INTRODUÇÃO .....	63
3.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	64
1.3.1. MATERIAL .....	64
1.3.2. MÉTODOS .....	65
3.3.2.1. Enzimas .....	65
3.3.2.2. Composição centesimal da farinha de trigo .....	65
3.3.2.3. Atividade da $\alpha$ -amilase na farinha ( <i>stirring number</i> – SN) .....	66
3.3.2.4. Ação da xilanase nas características reológicas e nas propriedades térmicas da farinha de trigo.....	66
3.3.2.4.1. Propriedades farinográficas.....	66
3.3.2.4.2. Propriedades extensográficas .....	67
3.3.2.4.3. Propriedades de pasta.....	67
3.3.2.4.4. Propriedades térmicas.....	68
3.3.2.5. Produção de pão.....	68
3.3.2.5.1. Método de panificação.....	68
3.3.2.5.2. Avaliação do volume e pH da massa .....	69
3.3.2.5.3. Avaliação do volume do pão .....	69
3.3.2.6. Estudo do envelhecimento do pão .....	69
3.3.2.6.1. Conteúdo de água do miolo e da crosta do pão .....	70
3.3.2.6.2. Avaliação da firmeza do miolo do pão .....	70
3.3.2.6.3. Retrogradação da amilopectina do miolo do pão.....	70
3.3.2.7. Estudo da suscetibilidade enzimática das arabinoxilanas da farinha de trigo, frente à ação da xilanase .....	70
3.3.2.7.1. Isolamento das arabinoxilanas da farinha de trigo.....	71
3.3.2.7.2. Ação da xilanase sobre as arabinoxilanas (WE-AX e WU-AX) isoladas da farinha de trigo .....	72
3.3.2.7.3. Análise dos produtos da reação da xilanase sobre as arabinoxilanas .....	72
3.3.2.8. Análise estatística.....	73
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73

3.3.3.	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA FARINHA DE TRIGO .....	73
3.3.4.	ATIVIDADE DA ALFA-AMILASE NA FARINHA (STIRRING NUMBER - SN).....	76
3.3.5.	AÇÃO DA XILANASE NAS CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS E TÉRMICAS DA FARINHA DE TRIGO .....	76
3.3.5.1.	<b>Propriedades farinográficas</b> .....	77
3.3.5.2.	<b>Propriedades extensográficas</b> .....	78
3.3.5.3.	<b>Propriedades de pasta</b> .....	79
3.3.5.4.	<b>Propriedades térmicas</b> .....	81
3.3.6.	AÇÃO DA XILANASE NAS CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DA MASSA E DO PÃO .....	82
3.3.6.1.	<b>Avaliação do volume e pH da massa</b> .....	82
3.3.6.2.	<b>Avaliação do volume do pão</b> .....	84
3.3.7.	AÇÃO DA XILANASE NO ENVELHECIMENTO DO PÃO .....	85
3.3.7.1.	<b>Conteúdo de água do miolo e da crosta do pão</b> .....	85
3.3.7.2.	<b>Avaliação da firmeza do miolo do pão</b> .....	87
3.3.7.3.	<b>Retrogradação da amilopectina do miolo do pão</b> .....	88
3.3.8.	ESTUDO DA SUSCETIBILIDADE ENZIMÁTICA DAS ARABINOXILANAS DA FARINHA DE TRIGO, FRENTE À AÇÃO DA XILANASE .....	89
3.3.8.1.	<b>Análise dos produtos de reação da xilanase sobre as arabinoxilanas WU-AX e WE-AX isoladas da farinha de trigo, por HPAEC-PAD</b> .....	89
3.4.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	95
3.5.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	96

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1.	Efeito da xilanase sobre a firmeza do miolo durante o armazenamento do pão a 4 °C	87
Figura 3.2.	Efeito da xilanase sobre a entalpia de retrogradação do miolo do pão durante o armazenamento a 4°C .....	88
Figura 3.3.	Perfil cromatográfico obtido por HPAEC-PAD da degradação das WU-AX (A) incubadas com xilanase a 70°C em diferentes tempos .....	91
Figura 3.4.	Perfil cromatográfico obtido por HPAEC-PAD da degradação das WU-AX (A) incubadas com xilanase a 70°C em diferentes tempos .....	92
Figura 3.5.	Concentração de xilose (A) e xilobiose (B) obtidos da degradação das arabinoxilanas WU-AX e WE-AX isoladas da farinha de trigo, incubadas a 32°C e 70°C, em função do tempo e detectadas por HPAEC-PAD .....	94

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1.	Composição química da farinha de trigo <sup>1</sup> (em %) .....	74
Tabela 3.2.	Parâmetros farinográficos característicos de farinhas com diferentes forças.....	77
Tabela 3.3.	Efeito da xilanase sobre as características farinográficas da farinha de trigo .....	78
Tabela 3.4.	Efeito da xilanase sobre as características extensográficas da farinha de trigo.....	79
Tabela 3.5.	Efeito da xilanase sobre as propriedades de pasta <sup>1</sup> da farinha de trigo .....	80
Tabela 3.6.	Efeito da xilanase sobre as propriedades térmicas de gelatinização <sup>1</sup> da farinha de trigo <sup>a</sup> .....	81
Tabela 3.7.	Efeito da xilanase sobre a entalpia de retrogradação <sup>1</sup> da farinha durante o armazenamento a 4°C .....	82
Tabela 3.8.	Efeito da xilanase sobre o volume e pH da massa .....	83
Tabela 3.9.	Volume específico dos pães controle e dos adicionados de xilanase parcialmente purificada .....	84
Tabela 3.10.	Conteúdo de água do miolo dos pães controles e adicionados de xilanase parcialmente purificada.....	86
Tabela 3.11.	Conteúdo de água da crosta dos pães controles e adicionados de xilanase parcialmente purificada.....	86
Tabela 3.12.	Produtos obtidos da degradação das arabinoxilanas insolúveis (WU-AX), pela xilanase, a temperatura de 32°C durante 48h, detectados por HPAEC-PAD.....	93
Tabela 3.13.	Produtos obtidos da degradação das arabinoxilanas insolúveis (WU-AX), pela xilanase, a temperatura de 70°C durante 48h, detectados por HPAEC-PAD.....	93

### 3.1. Introdução

O envelhecimento do pão é um fenômeno complexo, que ocorre durante seu armazenamento em função, principalmente, da migração de água e das transformações que ocorrem no amido durante este período. As alterações relacionadas com o envelhecimento do pão incluem aumento da umidade da crosta (perda da crocância), aumento da cristalinidade do grânulo de amido, aumento da firmeza do miolo, perda das propriedades organolépticas do pão e da capacidade de hidratação do miolo (HOSENEY, 1984; GRAY; BEMILLER, 2003; RIBOTTA; BAIL, 2007).

O mecanismo de envelhecimento dos pães vem sendo estudado há vários anos, mas até o momento sua completa elucidação não foi alcançada. Durante anos, acreditou-se que a retrogradação da amilopectina era o único fenômeno responsável pelo aumento da firmeza do miolo durante o armazenamento dos pães. De acordo com Zobel e Kulp, (1996) durante este período, a amilopectina vai se reorganizando através da formação de duplas hélices (retrogradação) em uma estrutura mais cristalina, conferindo maior rigidez ao grânulo intumescido e ao material intergranular promovendo assim, maior firmeza do miolo do pão. No entanto, vários autores concordam que o envelhecimento do pão não é função apenas da retrogradação da amilopectina (MALEKI, HOSENEY, MATTERN (1980); HE, HOSENEY (1990); MARTIN, ZELEZNAK, HOSENEY (1991); MARTIN, HOSENEY (1991). De acordo com Martin, Zeleznak, Hoseney (1991), o aumento da firmeza do miolo dos pães ocorre devido às interações entre o grânulo de amido remanescente da gelatinização e o glúten. Sabe-se também que a prevenção da perda de água do miolo para a crosta pode retardar o processo de envelhecimento do pão (PIAZZA, MASI, 1995).

Alterações no amido e no glúten durante o armazenamento levam a perda e/ou redistribuição da água no sistema. No entanto, apesar de terem preservado a umidade durante o armazenamento, pães sem crosta continuaram a apresentar aumento da firmeza do miolo (HE, HOSENEY, 1990). Portanto, o entendimento das interações amido-água e glúten-água ainda são controversos e necessitam de estudos complementares.

Tradicionalmente o pão é produzido a partir da farinha de trigo. O principal constituinte da farinha de trigo é o amido, porém proteínas, lipídios e polissacarídeos não amiláceos como as arabinoxilanas também influenciam na processabilidade e qualidade do produto final (GOESAERT et al, 2005). As arabinoxilanas (AX) da farinha de trigo são classificadas em arabinoxilanas extraídas com água (*water-extractable arabinoxylan* - WE-AX) e arabinoxilanas não extraídas com água (*water-unextractable arabinoxylan* - WU-AX). (COURTIN; DELCOUR, 2002). Nos cereais esses polímeros são constituídos de uma cadeia principal formada por unidades de D-xilopiranosil unidas por ligações glicosídicas -1,4, podendo ser substituídas em

vários graus por moléculas de L-arabinose ligadas ao carbono C-2 e/ou C-3 da xilose por meio de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,2 e/ou  $\alpha$ -1,3 (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999; LI et al., 2000).

As indústrias de panificação vêm empregando diversos agentes com a finalidade de reduzir o envelhecimento de pães, entre eles, as enzimas vêm recebendo atenção especial. Enzimas que hidrolisam os polissacarídeos não amiláceos como as xilanases, têm mostrado efeitos benéficos melhorando as propriedades reológicas da massa, o volume específico do pão, a textura do miolo e reduzindo a taxa de envelhecimento (MARTINEZ-ANAYA; JIMENEZ, 1997; LAURIKAINEN et al, 1998; SHAH; SHAH, MADAMWAR, 2006; CABALLERO, GÓMEZ, ROSELL, 2007). No entanto, a maioria dos estudos mostra a ação de xilanases mesofílicas e pouco se encontra sobre a aplicação de xilanases termofílicas. A vantagem do uso de enzimas termoestáveis adviria da sua ação continuada durante a etapa de forneamento, momento de maior atividade. Estudos recentes usando endoxilanase termofílica recombinante permitiram aos autores constatarem a redução da firmeza do miolo e da retrogradação da amilopectina durante o armazenamento (JIANG et al., 2005; JIANG; BAIL; WU, 2007). Em um estudo recente foi verificado que o fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* é um bom produtor de xilanase termoestável (DA-SILVA et al., 2005).

Segundo Courtin, Delcour, 2001 xilanases que preferencialmente atacam o substrato WU-AX, causam um impacto positivo sobre as propriedades da massa e volume do pão. Assim, hoje o grande desafio é obter xilanases que atuem sobre as WU-AX, modificando sua estrutura e funcionalidade.

O efeito das xilanases sobre a taxa de envelhecimento de pães é ainda incompleto, no que diz respeito ao processo em si e ao mecanismo de ação dessas enzimas. O objetivo deste trabalho foi estudar a influência da xilanase termoestável, presente no extrato parcialmente purificado produzido pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, no processo de envelhecimento do pão de trigo, bem como identificar sua especificidade e os produtos liberados da sua ação sobre as arabinoxilanas.

## **3.2. Material e Métodos**

### **3.3.1 Material**

Farinha de trigo obtida da moagem de grãos duros, adequada para produção de pão, gentilmente doada pelo moinho Sete Irmãos (Uberlândia, Brasil), foi usada neste trabalho. Outros ingredientes para confecção dos pães foram obtidos do comércio local (São José do Rio Preto, Brasil). Bentonite obtida da Acros Organics, (New Jersey, USA) e etanol anidro obtido da Synth (Diadema, Brasil) foram utilizados para o isolamento das arabinoxilanas. Todos os outros reagentes utilizados foram puros para análise. Os padrões cromatográficos grau

HPLC, arabinose e xilose foram adquiridos da Fluka (Madrid, Espanha) e o padrão de glicose foi obtido da Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Os padrões dos xilooligossacarídeos com DP 2-6 ( $X_2$ - $X_6$ ) foram adquiridos da Megazyme (Bray, Irlanda).

### 3.3.2 Métodos

#### 3.3.2.1. Enzimas

A enzima utilizada neste estudo foi a xilanase parcialmente purificada, produzida pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756. O extrato enzimático contendo xilanase estava livre das enzimas amilolíticas  $\alpha$ -amilase e glucoamilase. A enzima  $\alpha$ -amilase (*Aspergillus oryzae*) foi gentilmente fornecida pela Granotec, (Curitiba, Brasil) e a amiloglicosidase foi isolada de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificado no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da Universidade Estadual Paulista (São José do Rio Preto, Brasil).

As atividades da xilanase e da endoglucanase (CMCase) foram determinadas pela incubação de 0,1 mL da solução enzimática apropriadamente diluída com 0,9 mL de solução contendo 0,5% de xilana birchwood (Sigma) e da solução de carboximetilcelulose (40,0 g/L) (CMC-Sigma C5768), em tampão acetato 0,10 M, pH 5,0). Após a incubação a 60°C por 10 min, 1 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS) foi adicionado para completar a reação. Os açúcares redutores liberados da reação foram determinados de acordo com [Miller \(1959\)](#). Uma Unidade Internacional (IU) de atividade enzimática foi definida como 1  $\mu$ mol de equivalente de xilose (xilanase) ou glicose (CMCase) liberada por minuto dentro das condições de ensaio mencionadas acima, utilizando curvas padrão de xilose e de glicose, respectivamente.

A atividade da  $\beta$ -glicosidase foi determinada pela incubação de 50  $\mu$ L do extrato enzimático em 250  $\mu$ L de tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 e 250  $\mu$ L de 4-nitrofenol  $\beta$ -D-glicopiranosídeo 4 mM (PNPG, Sigma). A reação foi mantida a uma temperatura de 60°C por 10 min. A reação enzimática foi paralisada pela adição de 2 mL de carbonato de sódio 2 M e o nitrofenol liberado, foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de nitrofenol por minuto de reação.

#### 3.3.2.2. Composição centesimal da farinha de trigo

Os teores de lipídio bruto, proteína bruta e cinzas da farinha de trigo foram determinadas pelos métodos 30-10, 46-12 e 08-12, respectivamente, dos [Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists \(AACC\) \(2000\)](#). Para o cálculo do teor de proteína foi usado um fator de Nx5,7. O conteúdo de água da farinha de trigo foi analisado com

o auxílio de um analisador de umidade por infravermelho (AND – modelo MX-50). Amostras de 1 g de farinha foram usadas para a análise. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O teor de carboidratos foi determinado por diferença. O conteúdo de fibra alimentar total foi determinado de acordo com [Horwitz \(2005\)](#) e [Prosky et al. \(1984\)](#).

Os parâmetros alveográficos e de índice de glúten constam do laudo técnico da farinha de trigo fornecida pelo Moinho Sete Irmãos. Os parâmetros alveográficos foram: pressão máxima ( $P=133 \text{ mmH}_2\text{O}$ ), abscissa média de ruptura ( $L=76 \text{ mm}$ ), índice de inchamento ( $G=19,4$ ), energia de deformação da massa ( $W=386 \text{ 10E-4J}$ ) e índice de configuração da curva ( $P/L=1,75$ ). Os parâmetros de índice de glúten foram: GI=glúten index (96,39%), GU=glúten úmido (29,65%) e GS=glúten seco (10,44%).

### **3.3.2.3. Atividade da $\alpha$ -amilase na farinha (*Stirring number* – SN)**

A capacidade da  $\alpha$ -amilase em interferir na viscosidade da farinha de trigo foi determinada utilizando um Rápido Viscoanalisador (*Rapid Visco Analyser* - RVA-4, Newport Scientific, Austrália), de acordo com o método [22-08 da AACC \(2000\)](#). Suspensões de 3,5 g de farinha de trigo (para 14% de umidade) com 25 mL de água deionizada foram colocadas em recipientes de alumínio próprios do equipamento e acoplados ao RVA. A temperatura de análise foi de 95°C e foram necessários 3 minutos para completar o experimento. Durante todo o experimento o RVA manteve as suspensões sob agitação a 160 rpm. O programa Termoclines for Windows foi utilizado para o processamento dos resultados. O experimento foi realizado em duplicata.

### **3.3.2.4. Ação da xilanase nas características reológicas e nas propriedades térmicas da farinha de trigo**

#### **3.3.2.4.1. Propriedades farinográficas**

As concentrações de xilanase usadas neste estudo foram determinadas a partir de testes preliminares avaliando-se o volume específico dos pães.

A qualidade da farinha de trigo, essencialmente a resistência da massa a mistura é determinada por suas propriedades reológicas em particular pela viscosidade. As propriedades farinográficas da farinha de trigo controle e adicionadas de 20U, 35U e 50U de xilanase por 100 g de farinha foram determinadas utilizando um farinógrafo Brabender (*Brabender, Duisburg, Alemanha*), de acordo com o [método 54-21 da AACC \(2000\)](#). Na primeira etapa foi determinada a quantidade de água necessária para que o centro da banda atingisse 500 UF (curva de titulação). Na segunda etapa 300 g de farinha de trigo (para 14% de umidade) foi

colocada na caixa misturadora e misturada por 1 minuto. Em seguida foi adicionada água contendo a xilanase (quantidade pré-determinada durante a curva de titulação) a temperatura de 30°C, a caixa foi tampada e a massa foi misturada por 20 minutos. Durante todo o experimento o farinógrafo manteve as massas sob agitação a 63 rpm.

#### **3.3.2.4.2. Propriedades extensográficas**

As propriedades da massa de resistir à extensão quando a mesma é esticada a uma velocidade constante foi determinada nas massas elaboradas com farinha de trigo controle e adicionadas de 20U, 35U e 50U de xilanase por 100 g de farinha utilizando um extensógrafo Brabender (*Brabender, Duisburg, Alemanha*), de acordo com o [método 54-10 da AACC \(2000\)](#). Na primeira etapa 300 g de farinha de trigo (para 14% de umidade) foi colocada na caixa misturadora do farinógrafo e misturada por 1 minuto. Em seguida foi adicionada água contendo a xilanase, e 2% de sal a temperatura de 30°C e misturada durante 1 minuto. A quantidade de água adicionada inicialmente foi 4% menor em relação à obtida anteriormente na titulação da massa sem sal (testes farinográficos). As massas que apresentaram consistência superior a 500 UF foram adicionadas de água até atingirem a consistência ótima (500 UF). Depois de um descanso de 5 minutos para o desenvolvimento da massa, a mesma foi misturada durante dois minutos. Na segunda etapa a massa foi dividida em duas porções de 150 g cada e no extensógrafo as massas foram boleadas, cilindradas e colocadas no suporte de prova. A cada período de 45, 90 e 135 minutos as mesmas massas foram submetidas à prova de extensão, e novamente foram boleadas, cilindradas e armazenadas na cabine de descanso a uma temperatura de 30°C. Os cálculos foram realizados a partir das duplicatas referentes ao tempo de descanso de 135 minutos.

#### **3.3.2.4.3. Propriedades de pasta**

A qualidade do empastamento do amido da farinha, em particular a sensibilidade do amido a  $\alpha$ -amilase endógena da farinha de trigo controle e das adicionadas de 20U, 35U e 50U de xilanase por 100 g de farinha foram determinadas utilizando um Rápido Viscoanalisador (*Rapid Visco Analyser - RVA-4, Newport Scientific, Austrália*), de acordo com o [método 76-21 da AACC \(2000\)](#). O perfil utilizado foi o padrão 1 (*Standard 1*). Suspensões de 3,5 g de farinha de trigo (para 14% de umidade) com 25 mL de água deionizada contendo xilanase foram colocadas em recipientes de alumínio próprios do equipamento e acopladas ao RVA. No início da análise, o RVA foi mantido a 50°C durante 1 minuto; após este tempo, aqueceu a uma razão de 13°C/minuto até atingir 95°C e permaneceu nesta temperatura por 2,7 minutos; então resfriou até 50°C também a 13°C/minuto e permaneceu nesta temperatura até o final da

análise. Foram necessários 13 minutos para completar o experimento. Durante todo o experimento o RVA manteve as suspensões sob agitação a 160 rpm. O programa Termoclines for Windows foi utilizado para o processamento dos resultados. Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

#### **3.3.2.4.4. Propriedades térmicas**

As propriedades térmicas da farinha de trigo controle e das adicionadas de xilanase (20U, 35U e 50U/100 g de farinha) foram determinadas utilizando um Calorímetro Diferencial de Varredura (*Differential Scanning Calorimeter* – DSC, Pyris 1 Perkin Elmer, USA) de acordo com método descrito por [Haros et al. \(2002\)](#), com modificações. Amostras de 3 mg em base seca de farinha foram pesadas recipientes de alumínio próprios para o equipamento (marca Perkin Elmer), misturadas com 9 µL de água deionizada com e sem enzima e seladas em aparelho acessório do DSC. Após os recipientes selados serem mantidos por 2 horas em temperatura ambiente, foram colocados no equipamento e aquecidos a uma razão de 5°C/minuto de 25°C a 125°C. Um recipiente de alumínio vazio foi utilizado como referência. As temperaturas de transição (inicial, de pico e final) e a variação de entalpia da farinha foi determinada utilizando o software Pyris 1 da Perkin Elmer, EUA. As panelinhas com a farinha de trigo gelatinizada (amido) foram armazenadas a 4°C por 3, 5, 7 e 10 dias para o estudo da influência da xilanase e da CGTase sobre a retrogradação da amilopectina. A temperatura de 4°C foi escolhida para acelerar o processo de retrogradação da amilopectina. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **3.3.2.5. Produção de pão**

##### **3.3.2.5.1. Método de panificação**

A quantidade de água adicionada foi determinada de acordo com a absorção de água da farinha determinada em farinógrafo (Brabender) e descrita no laudo técnico da farinha, fornecido pelo Moinho Sete Irmãos. A xilanase nas concentrações de 20U, 35U e 50U xilanase/100 g de farinha foram adicionadas à água a 50°C para ativação da enzima (termoestável). Como os resultados obtidos não foram satisfatórios, a adição de xilanase na água de panificação a temperatura ambiente, fez-se uma ativação prévia da enzima termoestável a 50°C/10 min. na água de panificação. Após este período a temperatura da água foi reduzida para 40°C para o preparo do pão, para evitar uma pré-gelatinização do amido antes do forneamento. A enzima foi dissolvida na água para garantir o amplo acesso em toda a massa.

A massa do pão foi formulada com farinha de trigo, fermento biológico seco (*Saccharomyces cerevisiae*) (2%), sal (1,5%), açúcar (4%), gordura vegetal hidrogenada (3%) e água (60%). As porcentagens (%) foram usadas em relação ao peso da farinha. Nos pães adicionados de xilanase parcialmente purificada nas concentrações de 20, 35 e 50 U/100 g de farinha, a enzima foi dissolvida na água usada para a produção dos pães, para garantir seu amplo acesso em toda a massa durante o processo de mistura. A farinha, o açúcar, a gordura vegetal e parte da água foram adicionadas e misturadas por 1 min em batedeira planetária (Lieme, BP-12SL, Brasil). O restante da água com o fermento foi adicionado e misturado por mais 1 min. Por último, o sal foi adicionado à massa, e a mesma foi misturada por 15 min para o desenvolvimento do glúten. A massa descansou por 10 min e foi dividida em porções de 100 g sofrendo um novo descanso de 15 min antes de ser cilindrada e modelada mecanicamente (Universo, MQ, Brasil), e enformada (formas 15x8 cm). O descanso final, a 32°C por 1 h foi necessário para o crescimento adequado da massa. O forneamento foi realizado a 180°C (forno turbo 240 classic, Pasiani, Brasil) por 10 min. Em seguida os pães foram esfriados por duas horas, a temperatura ambiente, antes dos testes de avaliação. Para o estudo do envelhecimento os pães foram armazenados em embalagens de polietileno e estocados a 4°C durante 10 dias.

#### **3.3.2.5.2. Avaliação do volume e pH da massa**

O aumento do volume das massas durante a fermentação foi determinado de acordo com o [método 22-14 da AACC \(2000\)](#) e foi calculado como a relação entre o volume final e o volume inicial da massa multiplicado por 100. O pH das massas foi determinado potenciométricamente (Marconi, Brasil).

#### **3.3.2.5.3. Avaliação do volume do pão**

O volume dos pães foi determinado após 2 h do término do forneamento de acordo com o método [10-05 da AACC \(2000\)](#), por deslocamento de sementes. O volume específico foi calculado como a relação volume/peso ( $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ ).

#### **3.3.2.6. Estudo do envelhecimento do pão**

Para o estudo do envelhecimento, os pães após o forneamento foram resfriados a temperatura ambiente por 2 horas antes de serem armazenados em embalagens de polietileno e estocados a 4°C por 10 dias. As análises do conteúdo de água, firmeza e de retrogradação da amilopectina dos pães controle e adicionados de xilanase descritas abaixo foram realizadas

nos dias 0, 3, 5, 7 e 10. Durante esse tempo, os pães foram armazenados a uma temperatura de 4°C. Os pães foram mantidos à temperatura ambiente por 30 minutos antes de serem analisados.

#### **3.3.2.6.1. Conteúdo de água do miolo e da crosta do pão**

O conteúdo de água do miolo e da crosta dos pães durante o armazenamento foi analisado com o auxílio de um analisador de umidade por infravermelho (AND, modelo MX-50, Japão). Amostras de 1 g de miolo (parte central) e da crosta (parte superior) foram usadas para a análise. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **3.3.2.6.2. Avaliação da firmeza do miolo do pão**

A firmeza do miolo dos pães foi determinada usando um texturômetro (modelo - TA-XT2i, Stable Micro Systems) de acordo com o [método 74-09 da AACC \(2000\)](#), usando o perfil de análise de textura “TPA” (*Texture Profile Analysis* – TPA). A força (Newton) máxima requerida para comprimir um pedaço do miolo (25 mm de espessura) a 40% de sua altura original, usando uma sonda circular (probe) de 2,5 cm de diâmetro, com intervalos de 5 segundos entre cada compressão, foi determinada e usada como o valor da firmeza do miolo. As amostras de miolo foram obtidas com o auxílio de um molde cilíndrico, que permitiu a retirada de pedaços de 2,5 cm de diâmetro da parte central dos pães.

#### **3.3.2.6.3. Retrogradação da amilopectina do miolo do pão**

A retrogradação da amilopectina do miolo dos pães foi determinada utilizando um Calorímetro Diferencial de Varredura (*Differential Scanning Calorimeter* – DSC, Pyris 1 Perkin Elmer, USA) de acordo com [Primo-Martín et al. \(2007\)](#), com modificações. Amostras de 3 mg de miolo foram pesadas em pequenos recipientes de alumínio próprios para o equipamento, misturadas com 9 µL de água deionizada e selados em aparelho acessório do DSC. Após os recipientes selados serem mantidos por 2 horas em temperatura ambiente, foram colocados no equipamento e aquecidos a uma razão de 5°C/min. de 25°C a 125°C. Um recipiente de alumínio vazio foi utilizado como referência. As temperaturas de transição (inicial, de pico e final) e a variação de entalpia do miolo foi determinada utilizando o software Pyris 1 da Perkin Elmer, EUA. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **3.3.2.7. Estudo da suscetibilidade enzimática das arabinoxilanas da farinha de trigo, frente à ação da xilanase**

### 3.3.2.7.1. Isolamento das arabinoxilanas da farinha de trigo

O isolamento das arabinoxilanas insolúveis em água (WU-AX) foi realizado de acordo com [Loosveld; Grobet; Delcour, \(1997\)](#) com modificações. Farinha de trigo (250 g) foi adicionada a 160 mL de água e misturada por 15 min. em batedeira planetária (Lieme, BP-12SL, Caxias do Sul, Brasil). A massa foi lavada com 2500 mL de água e esse volume foi centrifugado a 5000g/10 minutos a 15°C. Do precipitado, a camada escura denominada de squeegee fraction (SQF), que contém as WU-AX, amido e proteínas, foi separada manualmente da camada primária de amido. A SQF foi dissolvida em 250 mL de água e centrifugada a 10.000g/10 minutos a 15°C. Este processo de fracionamento foi repetido várias vezes para obter maiores quantidades de SQF. O SQF recuperado (400g) foi ressuspensionado em tampão acetato 0,1M, pH 4,5 (1:10 p/v) e aquecido a 90°C/10 minutos para gelatinizar o amido. Uma mistura de  $\alpha$ -amilase (10000U) e amiloglicosidase (80U) foi adicionada a amostra que foi incubada a 50°C/48 horas para degradar o amido residual. Após a incubação, a amostra foi passada por uma peneira (170  $\mu$ m) e centrifugada a 10.000g/15 minutos a 15°C. O resíduo foi lavado seis vezes em água para retirada de amido residual e proteínas solúveis. A amostra foi fervida por 15 minutos para inativação das enzimas, centrifugada como descrito acima e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol absoluto e seco em estufa com circulação de ar a 32°C.

O isolamento das arabinoxilanas solúveis em água (WE-AX) foi realizado de acordo com [Frederix et al. \(2004\)](#) com modificações. Farinha de trigo (200 g) foi aquecida a 130°C por 90 minutos em estufa com circulação de ar para inativação das enzimas endógenas. A farinha foi dispersa em água (1:10 p/v) a temperatura ambiente sob agitação constante por 90 minutos e posteriormente centrifugada a 3000g/15 minutos. O sobrenadante foi recuperado e aquecido a 90°C por 30 minutos, para precipitar as proteínas solúveis e para gelatinizar o amido. E novamente centrifugado a 10.000g/15 minutos. O sobrenadante recuperado pela segunda vez teve seu pH ajustado para 4,5 com HCl 0,01 M e uma mistura de  $\alpha$ -amilase (7000U) e amiloglicosidase (120U) foi adicionada à amostra que foi incubada a 50°C/12 horas para degradação do amido residual. Após este período, as enzimas foram inativadas pelo calor e a mistura centrifugada novamente. Uma alíquota do sobrenadante (100 mL) foi misturada a 0,2% de bentonite (10 mL) para absorção das proteínas, e a mistura foi mantida sob agitação constante a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente a mistura foi centrifugada a 10.000g/20 minutos, filtrada em papel de filtro Whatman (nº1) e o filtrado liofilizado usando-se um Thermo Savant, Micro Modulyo (New York, USA) acoplado a uma bomba de pressão (Savant VLP 200).

### 3.3.2.7.2. Ação da xilanase sobre as arabinoxilanas (WE-AX e WU-AX) isoladas da farinha de trigo

As arabinoxilanas insolúveis em água (WU-AX) e as solúveis em água (WE-AX) foram incubadas com xilanase isolada do fungo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 para hidrólise. Arabinoxilanas (3 mg/mL) em tampão acetato 0,1 M pH 5,0, foram adicionadas de 35U de xilanase e foram incubadas a 32°C e 70°C por 0,5, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas sob agitação constante. Amostras controle (sem enzima) foram preparadas e incubadas. As temperaturas de 32°C e 70°C foram usadas por serem as temperaturas de fermentação da massa e de estabilidade da enzima, respectivamente. Amostras controle (sem xilanase) também foram preparadas. Após os períodos de incubação, as amostras foram centrifugadas a 9.000g/10 minutos e o sobrenadante recuperado. Posteriormente o sobrenadante foi fervido para a inativação da xilanase pelo calor, e novamente o mesmo foi centrifugado como descrito acima. Os produtos da reação da xilanase foram congelados, para posteriormente serem analisados por cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD).

### 3.3.2.7.3. Análise dos produtos da reação da xilanase sobre as arabinoxilanas

Os produtos da reação da xilanase obtidos como descrito acima foram analisados num sistema HPAEC-PAD (*High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*) (ICS 3000, Dionex Corporation, EUA) equipado com amostrador automático AS-40 de acordo com [Rantanen et al. \(2007\)](#), com modificações. Aliquotas das amostras foram filtradas em membrana 0,22 µm Millex-GV (Milipore, USA) e injetadas (20 µL) nas colunas analíticas CarboPac PA-100 e CarboPac PA-1. Os potenciais empregados foram 'standard quadruple' com os seguintes pulsos de potenciais e durações:  $E_1 = 0.10 \text{ V}$  ( $t_1 = 0.40 \text{ s}$ );  $E_2 = -2.00 \text{ V}$  ( $t_2 = 0.02 \text{ s}$ );  $E_3 = 0.60 \text{ V}$  ( $t_3 = 0.01 \text{ s}$ );  $E_4 = -0.10 \text{ V}$  ( $t_4 = 0,06 \text{ s}$ ). Os xilooligossacarídeos foram detectados e quantificados usando uma pré-coluna CarboPac PA-100 e uma coluna analítica CarboPac PA-100 (4 x 250mm, Dionex, Sunnyvale, USA). Os eluentes foram preparados com água deionizada ultra pura e degaseificados com  $\text{N}_2$ ; os eluentes utilizados na corrida foram: (A): 200 mM NaOH, (B): água deionizada ultra pura (18 mΩ.cm) e (C): 150 mM NaOH/500 mM acetato de sódio. A primeira fase da corrida foi isocrática com eluição de (-2,3-5.0 min: 50% B e 50% A) com um fluxo de 1 mL/minuto a 35°C. A segunda fase da corrida foi um gradiente linear de eluição de (5-25 min. de 44% A e 16% de C). Uma etapa de limpeza foi realizada durante 5 min. com 100% do eluente C, no final de cada corrida. Após a corrida a coluna foi estabilizada por 10 min com as condições iniciais (50% B, 50% A) fase isocrática, antes da próxima injeção. Xilobiose e os xilooligossacarídeos

(X<sub>3</sub>-X<sub>6</sub>) foram usados como referência. Na corrida realizada na coluna CarboPac PA-100 houve a coeluição da xilose e da glicose, não sendo possível a quantificação do monossacarídeo de interesse, a xilose. Por esse motivo, os monossacarídeos foram detectados e quantificados usando uma pré-coluna CarboPac PA-1 e uma coluna analítica CarboPac PA-1 (4 x 250mm, Dionex, Sunnyvale, USA). A corrida foi isocrática, com eluição de (-2.3-20 min: 95% B, 5% A) com um fluxo de 1 mL/minuto a 35°C. Uma etapa de limpeza foi realizada durante 5 min. com 100% do eluente C, no final de cada corrida. Glicose (G<sub>1</sub>), arabinose (A), e xilose (X<sub>1</sub>) foram usados como referência. Os dados obtidos das amostras foram interpretados pelo software Chromeleon, versão 6.8 (Dionex Corporation, USA). As amostras foram analisadas em duplicata.

### 3.3.2.8. Análise estatística

O delineamento experimental adotado para os experimentos foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo os tratamentos compostos por duas a três repetições. As análises de volume e textura dos pães foram realizadas com 10 e 7 repetições, respectivamente. Os dados foram avaliados através do programa ESTAT – Sistema para Análises Estatísticas, versão 2.0, abrangendo a análise de comparação de médias pelo teste de Tukey (p<0,05).

## 3.3. Resultados e discussão

### 3.3.3. Composição centesimal da farinha de trigo

A composição química da farinha de trigo usada neste trabalho foi fornecida pelo Moinho Sete Irmãos está apresentada na **Tabela 3.1**.

Segundo a Instrução Normativa nº 8, de 02 de julho de 2005 da ANVISA, entende-se por farinha de trigo o produto elaborado com grãos de trigo (*Triticum aestivum* L.) ou outras espécies de trigo do gênero *Triticum*, ou combinações por meio de trituração ou moagem e outras tecnologias ou processos. A granulometria da farinha de trigo não deve ser superior a 250 µm. O presente regulamento não se aplica às farinhas elaboradas com grãos de trigo da espécie *Triticum durum* (BRASIL, 2005). O objetivo da moagem é separar as camadas externas, incluindo a camada de aleurona, e o germe do endosperma, reduzindo seu tamanho a partículas de farinha (SLUIMER, 2005).

Os dados da composição química da farinha mostram uma porcentagem de carboidratos amiláceos (amido, maltose e dextrinas) de 71,07% e 3,50% de carboidratos não-amiláceos (fibra alimentar total). Entre os carboidratos não amiláceos estão as hemiceluloses, principalmente as arabinoxilanas (AX).

**Tabela 3.1.** Composição química da farinha de trigo<sup>1</sup> (em %).

<b>Componentes</b>	<b>Porcentagem</b>
Aguá	11,74 ± 0,11
Carboidratos*	71,07 ± 0,10
Proteínas**	11,78 ± 0,09
Fibra alimentar total	3,50 ± 0,06
Lipídeos	1,43 ± 0,02
Cinzas	0,48 ± 0,01

<sup>1</sup> Cada valor representa a média de três determinações, base seca.

\* Determinado por diferença.

\*\* Fator Nx5,7.

A farinha de trigo geralmente consiste de aproximadamente 80% de amido, 12% de proteínas, e o conteúdo de arabinoxilanas varia de 2% a 3% (COLLINS et al., 2006).

O amido possui várias funções no processo de panificação entre elas a formação da estrutura do miolo de pães, bolos e biscoitos, e atua como substrato para as  $\alpha$ -amilases e  $\beta$ -amilases endógenas da farinha para produzir açúcares fermentáveis que são substratos para as leveduras responsáveis pela fermentação dos produtos a base de farinha de trigo. Durante a metabolização desses açúcares as leveduras produzem e liberam gás carbônico (CO<sub>2</sub>), responsável pela expansão da massa influenciando a formação da estrutura do miolo do pão. O amido também serve de reservatório para a absorção de água por ser uma molécula polihidroxilada, e como diluente para o glúten, contribuindo para as propriedades viscoelásticas da massa (PIZZINATTO; ORMENESE, 1996; SAHLSTRØM; BAEVRE; BRÅTHEN, 2003).

Entre as farinhas de cereais, apenas a de trigo tem a habilidade de formar uma massa forte, coesa, capaz de reter o gás carbônico e produzir um produto esponjoso por meio da formação de uma rede constituída pelas proteínas gliadinas e gluteninas denominada de glúten (HOSENEY, 1991). A quantidade e a qualidade das proteínas da farinha de trigo influenciam a qualidade dos produtos de panificação fermentados (CABALLERO; GÓMEZ; ROSELL, 2007).

Os teores de proteína da farinha de trigo encontrados neste trabalho (11,78%) foram similares aos encontrados por Puppo; Calvelo; Amon (2005) e Jiang; Bail; Wu (2007) para farinha branca. Entretanto, Jiang et al. (2005); Patel; Waniska; Seetharaman (2005) encontraram teores de proteínas superiores de 14,0% e 13,0%, respectivamente para o mesmo tipo de farinha. Todos os autores citados acima usaram a farinha de trigo no processo de panificação.

Essa diferença no conteúdo de proteína está relacionada às diferentes variedades de trigo, e a diferenças no processo de moagem dos grãos. Para a legislação brasileira, a Instrução Normativa nº 8, preconiza que o teor de proteína não deverá ser inferior a 7,5% na base seca, considerando o valor de Nx5,7 (BRASIL, 2005).

O conteúdo de proteína é um dos fatores usados para distinguir as variedades de trigo. Os trigos classificados como mole são da variedade *T. compactum*, variedade que apresentam baixo conteúdo de proteína e são usados principalmente para a produção de bolos e biscoitos. O trigo da variedade *T. aestivum* (duro) apresenta quantidades de proteínas ideais para produção de produtos fermentáveis como o pão. Os trigos da variedade *T. durum* (durum) são caracterizados por apresentarem altas concentrações de proteínas e são usados para a produção de sêmola e semolina para elaboração de pastas (POMERANZ, 1988).

Segundo Sluimer (2005), durante a formação da massa as proteínas do trigo podem absorver um pouco mais do que o seu próprio peso em água, portanto, o aumento de 1% na concentração de proteína, aumenta em 1% a absorção de água da farinha. Deste modo, a quantidade de proteína interfere na absorção de água da farinha, alterando a formação do glúten durante o processo de mistura da massa.

O teor de cinzas encontrado neste trabalho foi inferior aos relatados na literatura por Jiang et al. (2005) e Jiang; Bail; Wu (2007), que encontraram 0,65% e 0,60% de cinzas para farinhas brancas, respectivamente. Segundo a Instrução Normativa nº 8, farinha de trigo tipo 1 é aquela obtida a partir do cereal limpo, degerminado com o teor máximo de cinzas de 0,8% na base seca, e o teor de água do produto deverá ser regulado pelas boas práticas de fabricação não podendo exceder a 15,0% (BRASIL, 2005).

As cinzas ou minerais são encontrados no farelo (camadas externas), principalmente na camada de aleurona, e menos de 2% são encontrados no endosperma (PIZZINATTO; ORMENESE, 1996).

O teor de cinzas da farinha de trigo está diretamente relacionado à taxa de extração. Farinhas com alto teor de cinzas apresentam uma alta taxa de extração, estando esta última relacionada à qualidade dos produtos de panificação (PIZZINATTO; ORMENESE, 1996). Pães elaborados com farinha de trigo integral (taxa de extração de 100%) apresentam características indesejáveis, como miolo escuro, devido à alta concentração de cinzas, e baixo volume específico, causado pela desestabilização do glúten pelo farelo durante a fermentação. Por outro lado, pães elaborados com farinhas do tipo “farinha branca” com taxa de extração entre 70% e 80% contém poucas partículas da camada de aleurona e conseqüentemente pouca cinza. Os pães produzidos com esta farinha apresentam características desejáveis como miolo claro e poroso, alto volume específico e características organoléticas próprias do produto (SLUIMER, 2005).

Com os dados da composição química da farinha e baseado na Instrução Normativa nº8, pode-se afirmar que a farinha de trigo usada neste trabalho é a do tipo 1.

### 3.3.4. Atividade da $\alpha$ -amilase na farinha (*Stirring number* – SN)

Produtos elaborados a base de farinha de trigo como pães, bolos, biscoitos e massas requerem farinhas com características tecnológicas específicas. A atividade da  $\alpha$ -amilase endógena da farinha de trigo determina o poder diastático das mesmas e é levada em consideração no que se refere ao uso da farinha na elaboração dos produtos mencionados acima, principalmente para a elaboração de pães e outros produtos fermentáveis.

O poder diastático da farinha pode ser determinado pelo teste de *stirring number* (número de agitação) ou pelo teste de “falling number”, pois, os dois testes estão correlacionados.

O *stirring number* informa indiretamente a atividade da  $\alpha$ -amilase endógena da farinha capaz de degradar o amido em dextrinas e açúcares fermentáveis. A  $\alpha$ -amilase quebra aleatoriamente as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 das moléculas de amilose e amilopectina em polímeros menores, causando uma redução da viscosidade da massa e um aumento no número de agitação (SN). A enzima atua lentamente no grânulo de amido nativo, mas hidrolisa rapidamente o amido danificado e/ou gelatinizado ([ATWELL, 2001](#)).

A farinha estudada neste trabalho apresentou um SN de 121, valor considerado adequado para a produção de pães de acordo com o manual “Applications Manual for the Rapid Visco Analyser” Newport Scientific (1998).

Em panificação, as  $\alpha$ -amilases são necessárias para sustentar a produção de açúcares fermentáveis requeridos na etapa de fermentação. Quando a farinha possui altos níveis de  $\alpha$ -amilase, o amido danificado é extensamente degradado e as dextrinas formadas são mais higroscópicas que o amido resultando numa massa e num miolo pegajoso ([POMERANZ, 1988](#)). Por outro lado, uma concentração muito pequena de  $\alpha$ -amilase na farinha resulta em pães com miolo seco e esfarelento pela falta de dextrinas.

### 3.3.5. Ação da xilanase nas características reológicas e térmicas da farinha de trigo

Para a determinação das concentrações de xilanase a serem usadas neste trabalho, testes preliminares, usando diferentes concentrações de enzimas na produção de pães foram realizados. Os dados obtidos do volume específicos dos pães foram usados para determinar as melhores concentrações de xilanase. Ficou estabelecido as concentrações de 20U, 35U e 50U de xilanase/100 g de farinha. Concentrações maiores foram testadas, mas descartadas devido à diminuição do volume dos pães em relação aos pães controle.

### 3.3.5.1. Propriedades farinográficas

As análises farinográficas avaliam o comportamento da farinha durante o processo de mistura da massa, permitindo classificá-la quanto a sua força e ao seu uso adequado. A **Tabela 3.2** apresenta os parâmetros farinográficos característicos da farinha com diferentes forças. Os parâmetros farinográficos das farinhas controle e das adicionadas de xilanase estão representados na **Tabela 3.3**.

**Tabela 3.2.** Parâmetros farinográficos característicos de farinhas com diferentes forças.

Farinha	Absorção (%)	Desenvolvimento (min)	Estabilidade (min)	I.T.M
Fraca	< 55	< 2,5	< 3	> 100
Média	54-60	2,5-4,0	3-8	60-100
Forte	> 58	4,0-8,0	8-15	15-50
Muito forte	> 58	> 10,0	> 15	< 10

Fonte: PIZZINATO, (1997).

I.T.M= Índice de Tolerância a Mistura

A farinha controle apresentou uma porcentagem de absorção de água, estabilidade e índice de tolerância a mistura (I.T.M) específicos de farinha forte. Com relação ao parâmetro tempo de desenvolvimento da massa, este foi característico de farinha muito forte (**Tabelas 3.2 e 3.3**). De acordo com a classificação apresentada por [Pizzinatto \(1997\)](#), os resultados da farinha controle usada neste trabalho, são característicos de farinha forte, ideal para a produção de pães.

Todas as concentrações de xilanase adicionadas à farinha de trigo aumentaram a absorção de água da mesma, sendo essa absorção proporcional a concentração de xilanase usada. Estes dados mostraram uma maior necessidade de água para as massas atingirem a consistência ótima (500UF) na presença de xilanase (**Tabela 3.3**). Ao contrário dos resultados deste trabalho, [Laurikainen et al. \(1998\)](#) e [Prabhasankar et al. \(2004\)](#) estudando a adição de xilanase isolada de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus oryzae*, respectivamente, em farinhas para produção de pães, não relataram nenhuma alteração na absorção de água pela farinha de trigo.

As arabinoxilanas presentes nos cereais e conseqüentemente nas farinhas podem ser divididas em arabinoxilanas solúveis em água (WE-AX) e arabinoxilanas insolúveis em água (WU-AX) ([COURTIN; DELCOUR, 2002](#)). As xilanases agem degradando as WU-AX e transformando-as em WE-AX. Segundo [Courtin; Roelants; Delcour \(1999\)](#), a redução das WU-AX na massa e a fragmentação das WE-AX possivelmente aumentam a capacidade de retenção da água pela massa. Das arabinoxilanas totais do trigo, mais de 60% são de WU-AX, por isso a importância de xilanases que degradam esse tipo de heteropolissacarídeo.

**Tabela 3.3.** Efeito da xilanase sobre as características farinográficas da farinha de trigo.

Farinha	Absorção (%)	Tempo de desenvolvimento (min)	Estabilidade (min)	Índice de tolerância a mistura (UF)
Controle	63,9	13,0	10,0	30
20U Xilanase*	65,8	13,0	9,5	30
35U Xilanase*	67,0	13,0	8,5	20
50U Xilanase*	68,2	12,0	8,5	20

\* Xilanase (U/100g farinha de trigo).

UF= Unidades Farinográficas

Nesse estudo, a atividade catalítica da xilanase isolada do fungo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 foi verificada utilizando como substrato xilana de madeira. No entanto, o aumento na absorção de água pela farinha com adição de xilanase sugere que esta enzima fúngica também degrada as arabinoxilanas da farinha de trigo.

Não houve alteração no tempo de desenvolvimento com exceção das massas adicionadas de 50U de xilanase, em que foi observada uma pequena redução. Com relação à estabilidade e o índice de tolerância a mistura das massas, a xilanase nas concentrações de 35 e 50U promoveu leve redução nesses parâmetros (**Tabela 3.3**).

Segundo [Pizzinatto; Ormenese \(1996\)](#), altos valores de índice de tolerância à mistura estão relacionados à menor tolerância da farinha a mistura. [Laurikainen et al. \(1998\)](#) e [Prabhasankar et al. \(2004\)](#), que trabalharam com xilanase de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus oryzae*, respectivamente, observaram que essas enzimas promoveram aumento no tempo de desenvolvimento e no índice de tolerância a mistura, e uma redução na estabilidade da farinha.

A presença da enzima xilanase alterou levemente a força da farinha, apenas aumentou a absorção de água, provavelmente pela quebra das arabinoxilanas com produção de carboidratos com menor massa molecular e mais higroscópicos.

### 3.3.5.2. Propriedades extensográficas

As análises extensográficas suplementam as informações fornecidas pelo farinógrafo, pois, massas preparadas com quantidade de água que proporcionam a mesma resistência à mistura podem apresentar ampla variação na resistência à extensão ([PIZZINATTO, 1997](#)). Os parâmetros extensográficos das farinhas controle e das adicionadas de xilanase estão representados na **Tabela 3.4**.

A farinha controle apresentou os parâmetros de resistência à extensão, extensibilidade e de número proporcional, específicos de farinha forte. De acordo com a classificação apresentada por [Pizzinatto \(1997\)](#) (**Tabela 3.2**), os resultados da farinha controle usada neste trabalho, são característicos de farinha forte, ideal para a produção de pães.

A elasticidade (resistência) e a elasticidade máxima aumentaram em todas as massas adicionadas de xilanase em relação as massas controle (**Tabela 3.4**). Estudos realizados por [Prabhasankar et al. \(2004\)](#) avaliando a adição de xilanase de *Aspergillus oryzae* mostraram um aumento na elasticidade e elasticidade máxima das massas adicionadas desta enzima. A adição de xilanase em todas as concentrações provocou uma leve redução da extensibilidade das massas (**Tabela 3.4**).

Os valores do número proporcional aumentaram com a adição de xilanase. Segundo [Pizzinatto \(1997\)](#), o valor do número proporcional relaciona a resistência (elasticidade) e a extensibilidade da massa, e farinhas com R/E acima de 2,5 são consideradas fortes.

**Tabela 3.4.** Efeito da xilanase sobre as características extensográficas da farinha de trigo.

<i>Farinha</i>	<i>Resistência (EU)</i>	<i>Resistência máxima (UE)</i>	<i>Extensibilidade (min)</i>	<i>Número proporcional (R/E)</i>
<i>Controle</i>	520	700	135	3,8
<i>20U Xilanase*</i>	820	940	105	7,8
<i>35U Xilanase*</i>	690	850	115	6,0
<i>50U Xilanase*</i>	640	840	120	5,3

\* Xilanase (U/100g farinha de trigo).

\*\* Parâmetros extensográficos após 135 minutos de fermentação.

A massa, para tolerar as etapas do processo de panificação como mistura, fermentação e moldagem entre outras, necessita de um equilíbrio entre sua elasticidade e extensibilidade, para ser considerada adequada para a produção de pão. A adição de xilanase aumentou a elasticidade e provocou uma leve redução na extensibilidade das massas. Essas alterações interferiram na força da farinha, aumentando-a e indicando que a xilanase melhorou as características reológicas da farinha.

### 3.3.5.3. Propriedades de pasta

Este teste avalia a qualidade de pasta do amido presente na farinha de trigo, em particular sua sensibilidade a  $\alpha$ -amilase endógena.

As propriedades de gelatinização e retrogradação do amido estão relacionadas a fatores genéticos e a fatores ambientais, que ocorrem durante o desenvolvimento da planta. Estes fatores influenciam as propriedades de pasta do amido e conseqüentemente as propriedades reológicas de alimentos a base de amido ([NARUENARTWONGSAKU, et al., 2004](#); [BLAZEK, COPELAND, 2008](#)). Deste modo, o estudo do comportamento de gelatinização e retrogradação do amido da farinha é importante para o controle da qualidade de produtos elaborados com esta matéria-prima.

Altos valores de viscosidade de pico indicam baixa atividade da enzima endógena  $\alpha$ -amilase. Quando a farinha é aquecida na presença de água, o amido presente sofre alterações irreversíveis, e essas alterações são dependentes da disponibilidade de água, da temperatura, da concentração de enzimas endógenas e de outros componentes adicionados à farinha. Durante o processo de gelatinização do amido presente na farinha, ocorre um aumento da viscosidade pelo intumescimento dos grânulos de amido (THOMAS; ATWELL, 1999). A  $\alpha$ -amilase quebra as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 do amido, liberando dextrinas e oligossacarídeos, reduzindo a viscosidade de pasta da farinha.

Durante o resfriamento da pasta de amido gelatinizado, ocorre a reorganização das moléculas de amilose e amilopectina denominada de retrogradação (THOMAS; ATWELL, 1999). Valores elevados de viscosidade final estão relacionados à retrogradação do amido gelatinizado, principalmente da amilose.

As propriedades de pasta da farinha de trigo controle e das adicionadas de xilanase, determinadas por meio do RVA, estão apresentadas na **Tabela 3.5**.

De acordo com o manual “Applications Manual for the Rapid Visco Analyser” Newport Scientific (1998), o pico de viscosidade (221 RVU) e a viscosidade final (246) encontrados para a farinha controle foram adequados para a produção de pão. Resultados semelhantes de viscosidade de pico (201 RVU), e viscosidade final (240 RVU) foram encontrados por Blazek; Copeland, (2008) trabalhando com farinha de trigo branca.

**Tabela 3.5.** Efeito da xilanase sobre as propriedades de pasta<sup>1</sup> da farinha de trigo.

Farinha	T. pasta (°C)	Pico viscosidade	Viscosidades (RVU)		
			Quebra	Viscosidade final	Setback
Controle	88,0 ± 1,1	221 ± 0,0	88,0 ± 0,1	246 ± 1,4	112 ± 1,5
20U xilanase*	88,0 ± 1,2	219 ± 1,4	88,1 ± 3,3	246 ± 0,4	115 ± 2,3
35U xilanase*	88,0 ± 0,0	217 ± 0,0	88,0 ± 0,4	243 ± 0,9	113 ± 0,5
50U xilanase*	88,0 ± 0,1	218 ± 1,2	88,5 ± 1,9	243 ± 3,4	114 ± 2,0

<sup>1</sup>Média de duas replicatas.

\* Xilanase (U/100g farinha de trigo).

A adição de xilanase em qualquer concentração alterou levemente as propriedades de pasta da farinha, o que já era esperado, uma vez que estes parâmetros estão relacionados com as transformações do amido durante seu aquecimento em água. Mesmo que a xilanase tenha atuado, transformando as arabinoxilanas da farinha de trigo em produtos com menor massa molecular e mais higroscópicos, estes produtos não afetaram de maneira perceptível a disponibilidade de água, de modo a afetar a gelatinização do amido.

### 3.3.5.4. Propriedades térmicas

Os parâmetros de gelatinização da farinha de trigo controle e das adicionadas de xilanase estão apresentados na **Tabela 3.6**.

A farinha controle mostrou faixa de temperatura de gelatinização de 54,78 a 67,19 com uma variação de entalpia de 5,82 (**Tabela 3.6**).

Estudos sobre as propriedades térmicas de diferentes farinhas de trigo com concentrações de proteínas que variavam de 10% a 13% mostraram temperaturas de picos de gelatinização entre 61°C e 65°C, resultados próximos aos encontrados neste trabalho (ELIASSON; GUDMUNDSSON; SVENSSON, 1995; ADDO; XIONG; BLANCHARD, 2001; SAHLSTRØM; BAEVRE; BRÅTHEN, 2003; PUPPO; CALVELO; AÑÓN, 2005).

A presença de xilanase em qualquer concentração, não alterou as temperaturas de gelatinização ( $T_0$ ,  $T_p$ ,  $T_f$ ) e a variação da entalpia de retrogradação ( $\Delta H_r$ ) da farinha (**Tabela 3.6**). Outros pesquisadores realizaram experimento semelhante usando xilanase, e também não observaram qualquer diferença nas temperaturas e entalpia de gelatinização da farinha (HAROS; ROSELL; BENEDITO, 2002).

**Tabela 3.6.** Efeito da xilanase sobre as propriedades térmicas de gelatinização<sup>1</sup> da farinha de trigo<sup>a</sup>.

Farinha	$T_0(^{\circ}\text{C})$	$T_p(^{\circ}\text{C})$	$T_f(^{\circ}\text{C})$	$\Delta H_r(\text{J/g})$
Controle	54,78 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	61,66 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	67,19 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	5,82 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>
20U xilanase**	55,18 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	61,86 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	67,65 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	6,20 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>
35U xilanase**	55,27 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	61,81 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	67,44 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	5,84 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>
50U xilanase**	55,22 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	61,92 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	67,53 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	5,99 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

<sup>1</sup> Média de três replicatas.

\*  $T_0$ ,  $T_p$ ,  $T_f$  = temperatura inicial, de pico e final, respectivamente;  $\Delta H$ : variação de entalpia.

\*\* Xilanase (U/100g farinha de trigo).

Todas as amostras de farinhas gelatinizadas foram armazenadas por vários dias (3, 5, 7, e 10) a temperatura de 4°C, para o estudo da retrogradação do amido (**Tabela 3.7**). Com o resfriamento, as moléculas de amilose e amilopectina se reorganizam novamente através de pontes de hidrogênio, formando uma estrutura mais organizada, semelhante à estrutura predominante antes da gelatinização (ATWELL, 2001). O DSC avalia a energia necessária para fundir os cristais de amilopectina reorganizados durante o armazenamento (SHAIKH; GHODKE; ANANTHANARAYAN, 2007).

O pico endotérmico não foi observado em nenhuma das amostras até o terceiro dia de armazenamento. A partir do quinto dia observou-se um pequeno pico (48°C-50°C) para todas as amostras estudadas. No entanto, nas farinhas adicionadas de xilanase, em todas as

concentrações, esse aumento foi menos intenso que o observado para a farinha controle (**Tabela 3.7**). Ao final do período de armazenamento houve uma redução significativa na variação de entalpia de retrogradação de todas as amostras adicionadas da enzima em relação à amostra controle.

**Tabela 3.7.** Efeito da xilanase sobre a entalpia de retrogradação<sup>1</sup> da farinha<sup>a</sup> durante o armazenamento a 4°C.

Farinha	$\Delta H_r$ (J/g)			
	3 dias	5 dias	7 dias	10 dias
Controle	-	0,15 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,98 ± 0,09 <sup>a</sup>
20U xilanase*	-	0,14 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,28 ± 0,03 <sup>b</sup>
35U xilanase*	-	0,10 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,26 ± 0,04 <sup>b</sup>
50U xilanase*	-	0,17 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,00 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

<sup>1</sup> Média de três replicatas

\* Xilanase (U/100g farinha de trigo).

$\Delta H$ : variação de entalpia

Resultados semelhantes foram encontrados por [Haros; Rosell; Benedito, \(2002\)](#), que observaram uma retrogradação mais lenta nas amostras adicionadas de xilanase, após sete dias de armazenamento a 4°C.

Na temperatura final de análise (125°C) a enzima já está desnaturada. Provavelmente a ação da xilanase ocorre principalmente durante o aquecimento gradual das amostras (gelatinização) e seus efeitos são observados durante seu armazenamento.

Os produtos de reação da xilanase são mais higroscópicos e provavelmente alteram a distribuição da água no sistema, dificultando a retrogradação das moléculas de amilopectina.

### 3.3.6. Ação da xilanase nas características tecnológicas da massa e do pão

#### 3.3.6.1. Avaliação do volume e pH da massa

O aumento do volume das massas durante a fermentação e o pH das massas controle e das adicionadas de xilanase estão apresentados na **Tabela 3.8**.

A etapa de fermentação das massas ocorreu por um período de 1 hora a 32°C. O aumento no volume das massas adicionadas de xilanase nas concentrações de 20U, 35U e 50U foi de 34%, 40% e 17% maiores quando comparadas com as massas controle, respectivamente. O aumento no volume das massas durante a fermentação não foi proporcional à concentração de xilanase usada (**Tabela 3.8**).

**Tabela 3.8.** Efeito da xilanase sobre o volume e pH da massa.

Massa	Volume (%)	Aumento (%)	pH
Controle	214		4,8
20U xilanase*	286	(+34%)	4,8
35U xilanase*	300	(+40%)	5,1
50U xilanase*	250	(+17%)	4,9

\* Xilanase (U/100g farinha de trigo).

Testes preliminares mostraram que na temperatura de 32°C, a xilanase produzida pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, estava ativa, apesar de apresentar uma atividade catalítica sete vezes menor que na temperatura de 60°C.

O aumento do volume das massas, durante a fermentação pode ser decorrente da ação desta enzima sobre as arabinoxilanas insolúveis, quebrando as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 entre os resíduos de xilose da cadeia principal deste polímero. As moléculas com menor grau de polimerização produzidas pela ação da xilanase poderiam exercer uma influência positiva na formação do glúten, de tal forma que permitisse a formação de uma massa capaz de suportar melhor a pressão exercida pelo dióxido de carbono. É provável que as arabinoxilanas, principalmente as WU-AX afetem negativamente a formação do glúten. As análises extensográficas mostraram uma maior elasticidade e uma leve redução da extensibilidade das massas adicionadas dessa enzima (**Tabela 3.4**), o que reforça essa hipótese.

Além da ação sobre as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, esse extrato enzimático também poderia ter uma ação desramificante quebrando das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,2 e/ou  $\alpha$ -1,3, e deste modo removeria os resíduos de arabinose da arabinoxilana. Segundo [Pomeranz, \(1988\)](#) a remoção dos resíduos de arabinose promove uma precipitação das arabinoxilanas, o que reduziria a interferência negativa dessas moléculas na formação do glúten.

[Shah; Shah; Madamwar, \(2006\)](#), estudando a adição de xilanase de *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 em pão integral, obtiveram um aumento na expansão das massas de 22% em relação às massas controle, após 45 minutos de fermentação. Para esses pesquisadores, o aumento no volume da massa poderia ser explicado pela maior liberação de açúcares fermentáveis o que aceleraria o metabolismo da levedura e conseqüentemente, a liberação de gás carbônico. No entanto, a explicação dada por esses pesquisadores não condiz com o metabolismo do *Saccharomyces cerevisiae*, pois este microrganismo não fermenta nenhum tipo de pentose como a xilose e/ou arabinose ([CHU; LEE, 2007](#)).

O pH das massas variou pouco entre as amostras. O pH que mais se aproximou do pH ótimo da xilanase (pH 5,5) foi o da massa adicionada de 35U (**Tabela 3.8**). Essas massas também foram as que mais cresceram durante a etapa de fermentação. Resultados

semelhantes de pH de massas adicionadas de xilanase foram observados por [Haros; Rosell; Benedito, \(2002\)](#).

### 3.3.6.2. Avaliação do volume do pão

A qualidade do pão é normalmente avaliada levando em consideração as características externas e internas, aroma e gosto. As características externas usualmente avaliadas são: volume e característica e cor da crosta ([EL-DASH; CAMARGO; DIAZ, 1990](#)). O volume final do pão é uma característica importante a ser considerada para aceitação dos consumidores.

A **Tabela 3.9** apresenta o volume específico dos pães produzidos com e sem a adição de xilanase parcialmente purificada. A adição da xilanase provocou aumento significativo ( $p<0,05$ ) do volume específico dos pães, quando foi adicionada na concentração de 35U/100 g de farinha. No entanto, nas concentrações de 20 e 50U/100g de farinha, não houve diferença significativa nos volumes específicos dos pães em relação aos pães controle (sem enzima).

**Tabela 3.9.** Volume específico dos pães controle e dos adicionados de xilanase parcialmente purificada.

<i>Xilanase (U/100g de farinha de trigo)</i>	<i>Volume específico (g/mL)</i>
Controle	3,46 ± 0.38 <sup>b</sup>
20U xilanase	3,75 ± 0.22 <sup>b</sup>
35U xilanase	4,21 ± 0.45 <sup>a</sup>
50U xilanase	3,68 ± 0.34 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p<0.05$ ). Xilanase de *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756. Média e desvio padrão.

Pães adicionados de xilanase termoestável isolada de *Thermotoga marítima* MSB8 também mostraram volumes específicos superiores aos do pão controle ([JIANG et al., 2005; JIANG; BAIL; WU, 2007](#)). Resultados semelhantes também foram relatados por [Haros; Rosell; Benedito, \(2002\)](#) e [Laurikainen et al. \(1998\)](#). Estes últimos observaram aumento de 20% no volume específico dos pães adicionados de xilanase, valor muito semelhante ao encontrado neste trabalho (22%), quando 35U de xilanase por 100 g de farinha foram usados. No entanto, ([SHAH; SHAH; MADAMWAR, 2006](#)) observaram aumento de 56% no volume específico de pães em experimentos usando xilanase de *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 e farinha integral. Esse aumento mais pronunciado observado por esses pesquisadores pode ser devido à utilização da farinha integral que contém uma maior concentração de arabinoxilas e, conseqüentemente, maior disponibilidade do substrato para a atuação da xilanase, além do longo tempo de fermentação da massa durante o processo de panificação, o que favoreceu a natureza mesofílica da enzima usada.

Por outro lado, Keskin; Sumnu; Sahin. (2004) não observaram qualquer alteração no volume específico dos pães produzidos com farinha branca e adicionados de xilanase comercial. A influência positiva ou negativa da xilanase no volume específico dos pães provavelmente está relacionada com a quantidade e qualidade das arabinoxilanas presentes na farinha de trigo, que variam entre as espécies de trigo, assim como, com a especificidade da enzima para os diferentes substratos (COURTIN; DELCOUR, 2001). As WU-AX são capazes de prejudicar a formação do glúten pela interferência física desses polissacarídeos durante a formação das ligações intra e/ou intermoleculares das proteínas gliadinas e gluteninas (CAUVAIN, 2007). Portanto, xilanases que degradem as WU-AX, favorecem a obtenção de uma massa mais estável e flexível com maior capacidade de expansão durante o forneamento (MARTÍNEZ-ANAYA; JIMÉNEZ, 1997; COURTIN et al., 1999).

Neste trabalho, foi observado que ao final da fermentação, as massas adicionadas com a maior concentração de xilanase (50 U/100g de farinha) não foram capazes de reter o CO<sub>2</sub> produzido pelas leveduras durante essa etapa, interferindo diretamente no volume específico e demais características de qualidade dos pães. Segundo McCleary, 1986, a hidrólise excessiva das arabinoxilanas pode acarretar em um enfraquecimento do glúten, produzindo massas muito úmidas, pegajosas e incapazes de reter o CO<sub>2</sub> liberado durante a fermentação.

### **3.3.7. Ação da xilanase no envelhecimento do pão**

#### **3.3.7.1. Conteúdo de água do miolo e da crosta do pão**

As Tabelas 3.10 e 3.11 apresentam o conteúdo de água do miolo e da crosta dos pães adicionados de xilanase parcialmente purificada, armazenados a 4°C por 10 dias. O conteúdo de água do pão fresco está diretamente relacionada à sua maciez. O nível ideal de água de para o miolo de pães frescos está entre 35% e 40% (SHAH; SHAH; MADAMWAR, 2006).

No presente estudo, o conteúdo de água do miolo dos pães frescos esteve em torno de 40%. Durante o armazenamento houve uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no conteúdo de água do miolo dos pães controle até o quinto dia, enquanto os pães adicionados de 20U e 35U de xilanase por 100 g de farinha mostraram redução no conteúdo de água do miolo apenas até o terceiro dia de armazenamento. Já para os pães adicionados de 50U de xilanase por 100 g de farinha, a perda de água do miolo continuou até o sétimo de armazenamento. Ao final de dez dias, não foi observada qualquer diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no conteúdo de água do miolo dos pães controle e dos adicionados da enzima, e todos apresentaram um conteúdo de água satisfatório e em torno de 35% (Tabela 3.10). Com relação à crosta dos pães, durante o armazenamento, o conteúdo de água aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) até o terceiro dia, para todos os pães analisados e ao final de dez dias de armazenamento, os pães

apresentaram um conteúdo de água na crosta por volta de diferença 29% (**Tabela 3.11**). A redução do teor de água do miolo e o aumento na crosta durante o período de armazenamento indicaram que houve migração de água do miolo para a crosta.

**Table 3.10.** Conteúdo de água do miolo dos pães controles e adicionados de xilanase parcialmente purificada.

<i>Xilanase (U/100g de farinha de trigo)</i>	<i>Conteúdo de água do miolo %</i>				
	Dia 0	Dia 3	Dia 5	Dia 7	Dia 10
Controle	40,12 ± 0,48 <sup>aA</sup>	36,62 ± 0,55 <sup>aB</sup>	35,47 ± 0,20 <sup>aC</sup>	35,62 ± 0,13 <sup>aBC</sup>	36,31 ± 0,52 <sup>aBC</sup>
20U xilanase	38,61 ± 0,83 <sup>aA</sup>	34,81 ± 0,49 <sup>bB</sup>	35,20 ± 0,19 <sup>abB</sup>	34,35 ± 0,49 <sup>bB</sup>	34,79 ± 0,87 <sup>aB</sup>
35U xilanase	40,28 ± 0,77 <sup>aA</sup>	35,59 ± 0,38 <sup>abB</sup>	35,71 ± 0,39 <sup>aB</sup>	34,48 ± 0,38 <sup>bB</sup>	35,11 ± 0,62 <sup>aB</sup>
50U xilanase	40,23 ± 0,50 <sup>aA</sup>	35,32 ± 0,71 <sup>abB</sup>	34,50 ± 0,30 <sup>bBC</sup>	33,48 ± 0,45 <sup>bC</sup>	35,97 ± 0,85 <sup>aB</sup>

\*Valores seguidos pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey.

\*\*Valores seguidos pela mesma letra maiúscula na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey. ( $p < 0.05$ ).

Xilanase de *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756.

**Table 3.11.** Conteúdo de água da crosta dos pães controles e adicionados de xilanase parcialmente purificada.

<i>Xilanase (U/100g de farinha de trigo)</i>	<i>Conteúdo de água da crosta %</i>				
	Dia 0	Dia 3	Dia 5	Dia 7	Dia 10
Controle	24,25 ± 0,59 <sup>aC</sup>	27,65 ± 0,42 <sup>aB</sup>	28,39 ± 0,39 <sup>abB</sup>	28,05 ± 0,20 <sup>abB</sup>	29,58 ± 0,48 <sup>aA</sup>
20U xilanase	23,69 ± 0,31 <sup>aC</sup>	27,17 ± 0,65 <sup>aB</sup>	27,37 ± 0,60 <sup>abB</sup>	27,16 ± 0,32 <sup>bB</sup>	29,38 ± 0,64 <sup>aA</sup>
35U xilanase	24,17 ± 0,34 <sup>aC</sup>	27,97 ± 0,36 <sup>aAB</sup>	27,14 ± 0,60 <sup>bB</sup>	28,40 ± 0,30 <sup>aA</sup>	28,66 ± 0,13 <sup>aA</sup>
50U xilanase	23,72 ± 0,51 <sup>aC</sup>	27,42 ± 0,45 <sup>aB</sup>	28,70 ± 0,62 <sup>aAB</sup>	28,80 ± 0,67 <sup>aAB</sup>	29,75 ± 0,74 <sup>aA</sup>

\*Valores seguidos pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey.

\*\*Valores seguidos pela mesma letra maiúscula na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey. ( $p < 0.05$ ).

Xilanase de *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756.

Resultados semelhantes foram encontrados por [Jiang; Bail; Wu, \(2007\)](#) que usaram xilanase de *Thermotoga marítima* MSB8, em pães armazenados por 5 dias a 4°C. Já [Shah; Shah; Madamwar, \(2006\)](#), observaram uma umidade do miolo de pães frescos superior (40,5%) àqueles de pães adicionados de xilanase de *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 (32,3%).

As arabinoxilanas, embora presentes em pequena quantidade na farinha são ingredientes funcionais importantes. Elas absorvem quase dez vezes o seu peso em água, representando quase 30% da capacidade de absorção de água da farinha de trigo, e assim

exercem um efeito considerável, sobre a qualidade da massa e do pão (COURTIN; DELCOUR, 2002).

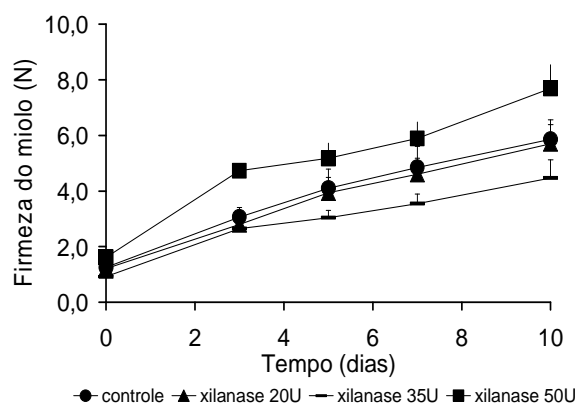
Xilanases com especificidade para as WU-AX poderiam reduzir a migração de água do miolo para a crosta, já que essas arabinoxilanas seriam degradadas a WE-AX devido à liberação dos oxigênios envolvidos nas ligações-O-glicosídicas com formação de uma hidroxila.

Entretanto, neste trabalho, não foi possível observar diferenças muito consideráveis entre os conteúdos de água dos miolos e crostas de pães controle e daqueles adicionados da enzima. A ação da xilanase sobre as arabinoxilanas da farinha de trigo pode apenas ter melhorado a redistribuição da água na massa, principalmente na etapa de forneamento, momento de maior atividade da enzima em função de sua natureza termofílica.

### 3.3.7.2. Avaliação da firmeza do miolo do pão

A **Figura 3.1** apresenta o perfil da firmeza dos miolos dos pães com e sem xilanase parcialmente purificada, armazenados a 4°C por 10 dias.

A firmeza do miolo de todos os pães estudados aumentou progressivamente até o décimo dia, sendo que após os cinco primeiros dias, esse aumento foi menos pronunciado. Praticamente não houve diferença no perfil de textura dos pães controle e daqueles adicionados de 20U de xilanase/100 g de farinha, a não ser ao final do armazenamento, em que os pães adicionados da enzima apresentaram uma leve redução (4%) na firmeza do miolo em relação àquela do pão controle.



**Figura 3.1.** Efeito da xilanase sobre a firmeza do miolo durante o armazenamento do pão a 4°C. Xilanase (U/100 g farinha de trigo).

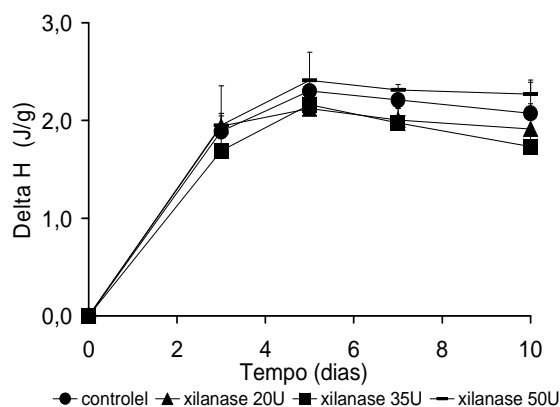
No entanto, para os pães adicionados de 35 e 50U de xilanase por 100 g de farinha, a enzima proporcionou um efeito positivo e negativo, respectivamente. Houve redução da firmeza do miolo dos pães adicionados de 35U de xilanase por 100g de farinha em relação àquela do pão controle a partir do terceiro dia de armazenamento, e em dez dias esta redução chegou a

25%, enquanto a firmeza do miolo dos pães adicionados de 50U/100 g de farinha aumentou, em relação àquela do pão controle, desde o primeiro dia, e este aumento atingiu 47% no último dia de armazenamento. Novamente esses resultados sugeriram que em maiores concentrações de enzima, uma hidrólise excessiva das arabinoxilanas poderia ocorrer, reduzindo a qualidade final do pão.

Jiang; Bail; Wu, (2007) observaram redução de 54% na firmeza do miolo dos pães adicionados da enzima xilanase termofílica isolada de *Thermotoga marítima* MSB8. A ação da enzima normalmente pode ser percebida num período de armazenamento curto. LAURIKAINEN et al. (1998) relataram redução de 27% na firmeza do miolo de pães adicionados de xilanase isolada de *Trichoderma reesei* após três dias de armazenamento, enquanto Keskin; Sumnu; Sahin, (2004) observaram redução de 18% em dois dias de armazenamento quando xilanase comercial foi usada.

### 3.3.7.3. Retrogradação da amilopectina do miolo do pão

A **Figura 3.2** apresenta o perfil de retrogradação da amilopectina do miolo dos pães com e sem xilanase parcialmente purificada, armazenados a 4°C por 10 dias. A gelatinização do amido causa uma desorganização da forma cristalina do grânulo resultando em um gel de estrutura amorfa. Entretanto, este gel não está em estado de equilíbrio. Mudanças ocorrem durante o seu armazenamento e são denominadas de retrogradação (ELIASSON; LARSSON, 2007).



**Figura 3.2.** Efeito da xilanase sobre a entalpia de retrogradação do miolo do pão durante o armazenamento a 4°C. Xilanase (U/100g farinha de trigo).

Um aumento progressivo na variação de entalpia de retrogradação ( $\Delta H_r$ ) para todos os pães estudados foi observado durante os cinco primeiros dias de armazenamento, após o que houve uma leve redução do  $\Delta H_r$ . Esses resultados eram esperados, já que a retrogradação da amilopectina gelatinizada é lenta. A adição de xilanase nas concentrações de 20U e 35U/100 g de farinha provocou leve redução do  $\Delta H_r$  e foi mais evidente a partir do

quinto dia de armazenamento. Ao final do período de armazenamento os pães adicionados de xilanase (20U e 35U) apresentaram uma redução 8% e 17% no  $\Delta Hr$  em relação aos pães controle, respectivamente. Novamente, o pão adicionado de maior concentração de enzima mostrou um aumento no  $\Delta Hr$  de 9% em relação ao  $\Delta Hr$  do pão controle. A redução do  $\Delta Hr$  da amilopectina e a redução da firmeza do miolo dos pães adicionados de enzima (35U/100 g de farinha), durante o armazenamento apresentaram uma correlação positiva de 0,85, sugerindo que os produtos formados a partir da ação da xilanase de certa forma dificultaram a reorganização da amilopectina e/ou interferiram na disponibilidade de água do sistema, retardando a retrogradação deste polímero.

Jiang; Bail; Wu, (2007) também observaram redução da entalpia de miolo de pães adicionados de xilanase de *Thermotoga marítima* MSB8. Dos resultados obtidos até o momento, foi possível observar que a concentração adequada para esta enzima foi de 35U/100g de farinha. A concentração de 50U/100g de farinha provavelmente provocou uma hidrólise excessiva das arabinoxilanas prejudicando a qualidade final do pão.

### **3.3.8. Estudo da suscetibilidade enzimática das arabinoxilanas da farinha de trigo, frente à ação da xilanase**

#### **3.3.8.1. Análise dos produtos de reação da xilanase sobre as arabinoxilanas WU-AX e WE-AX isoladas da farinha de trigo, por HPAEC-PAD**

Os produtos obtidos da hidrólise das arabinoxilanas da farinha pela xilanase parcialmente purificada foram identificados e quantificados por HPAEC-PAD. As **Figuras 3.3 e 4.4** mostram os picos dos produtos identificados após catálise enzimática das WU-AX. Nos cromatogramas apresentados na **Figura 3.3** estão identificados o dissacarídeo xilobiose ( $X_2$ ) seguido dos oligossacarídeos xilotriose ( $X_3$ ) e xilotetrose ( $X_4$ ). Xilooligossacarídeos com grau de polimerização (DP) maior não foram detectados. A identificação desses produtos indicou a presença de xilanases (endoxilanases e  $\beta$ -xilosidase) no extrato enzimático, as quais quebram as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 da cadeia principal das arabinoxilanas em moléculas menores. Foram detectados os monossacarídeos arabinose, glicose e xilose. Foi possível observar também que o monossacarídeo xilose eluiu junto com a glicose e sua separação e quantificação só foi possível quando as amostras foram analisadas na coluna cromatográfica PA-1, específica para monossacarídeos, e os resultados desta separação estão mostrados na **Figure 3.4**.

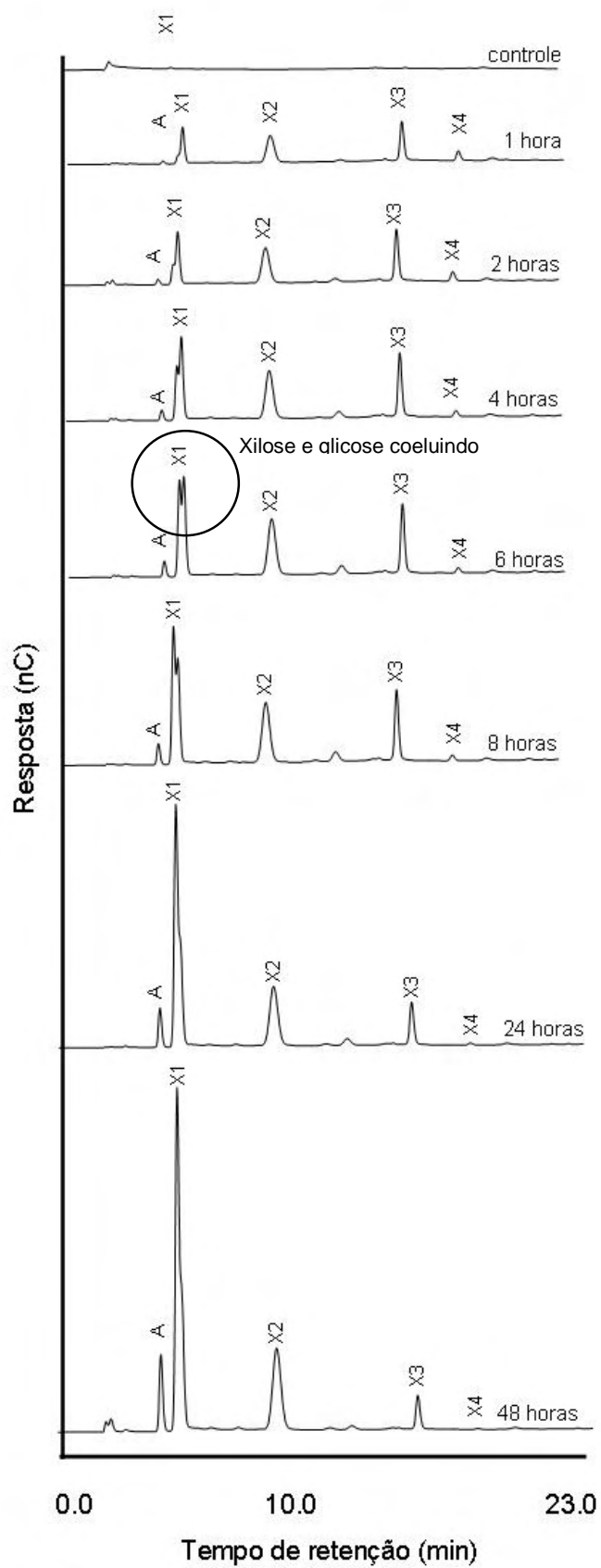
Os mesmos produtos de reação foram detectados quando as WE-AX foram usadas como substrato, no entanto, os picos detectados foram menores (dados não mostrados). Os resultados deste trabalho estão de acordo com os reportados por [Kalogeris et al. \(2001\)](#) e

Rantanen et al. (2007), que trabalhando com xilanases termofílicas de *Thermoascus aurantiacus* e *Aspergillus aculeatus*, respectivamente, detectaram arabinose, xilose, xilobiose e xilotriose como produtos da catálise enzimática das arabinoxilanas. Segundo Eliasson; Larsson, (2007) as WE-AX são compostas de xilose e arabinose, enquanto, as WU-AX são compostas de xilose, arabinose e glicose. Existem diferenças entre essas moléculas no que se refere ao grau de ramificação, de polimerização e a massa molecular. A degradação das arabinoxilanas depende do número e da posição dos pontos de ramificação, pois estes podem causar um impedimento estérico para a formação do complexo enzima-substrato durante a catálise. Possivelmente a estrutura das WE-AX tenha contribuído para a catálise menos pronunciada desse polímero.

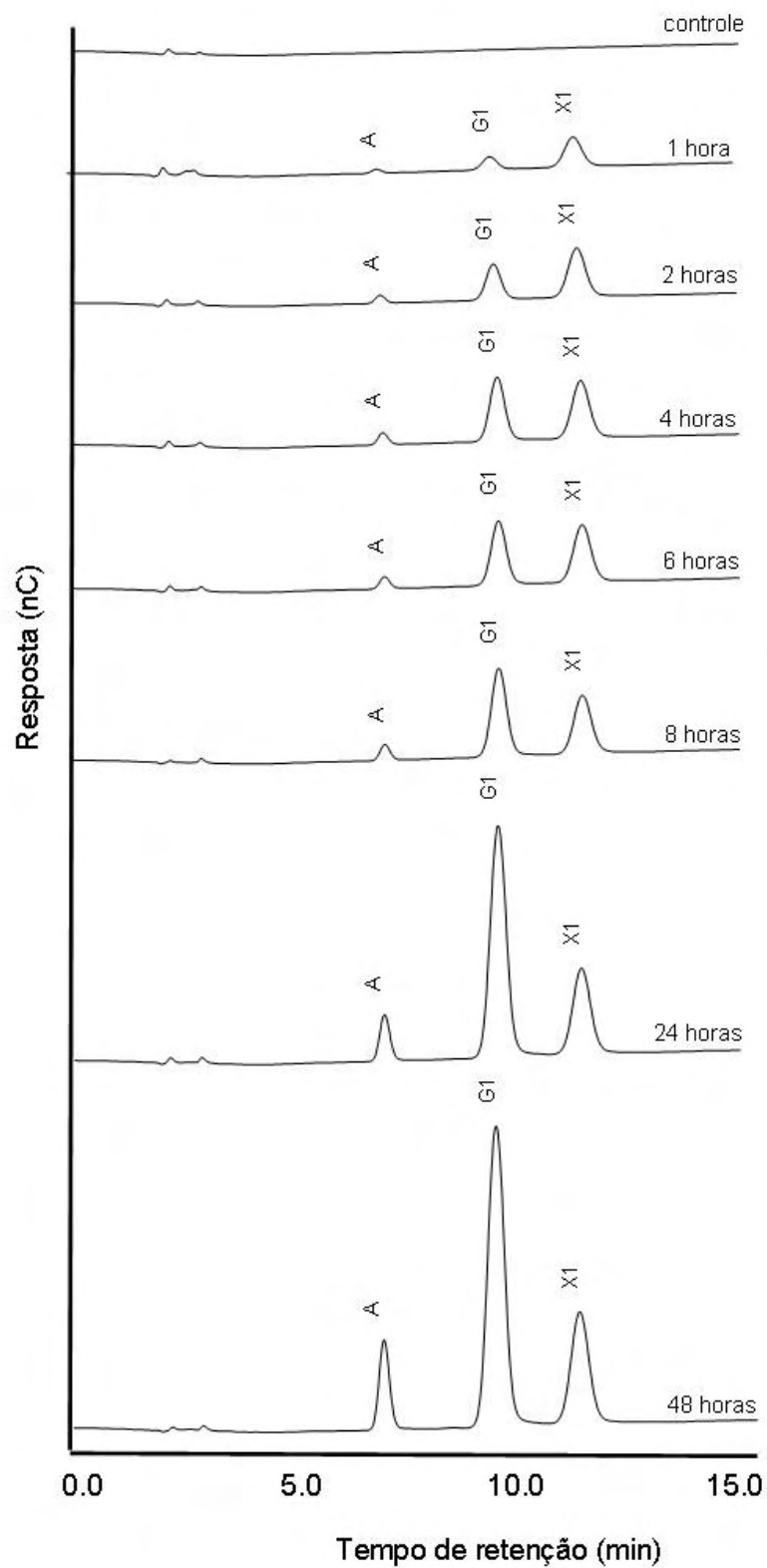
A ação da xilanase sobre as WU-AX aumentou gradativamente a área de pico da arabinose (A) (**Figuras 3.3 e 3.4**), durante o período de incubação, principalmente na temperatura de 70°C, sugerindo a presença de arabinofuranosidases (xilanases desramificadoras) no extrato enzimático estudado. Quando se usou as WE-AX como substrato, a área do pico da arabinose foi inferior às áreas encontradas quando as WU-AX foram usadas como substrato (dados não mostrados).

Enzimas desramificadoras são importantes no processo de hidrólise das arabinoxilanas, pois as ramificações restringem o acesso das xilanases sobre as ligações  $\beta$ -1,4 da cadeia principal (MARTÍNEZ-ANAYA; JIMÉNEZ, 1997). As arabinoxilanas da farinha de trigo são altamente ramificadas, contendo em média de 35% a 40% de substituinte arabinose. As arabinofuranosidases diferem quanto à especificidade pelo substrato. Algumas atuam estritamente nas ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,2 ou  $\alpha$ -1,3 dos resíduos de xilose monosubstituído, enquanto outras liberam a arabinose apenas unidas por ligações  $\alpha$ -1,3 em resíduos de xilose disubstituído. (PASTELL et al, 2008; GRUPPEN; KORMELINK; VORAGEN, 1993). Neste trabalho não foi possível identificar a especificidade das arabinofuranosidases encontradas no extrato enzimático produzido pelo *T. aurantiacus* CBMAI 756.

Foi verificada a presença de outras enzimas hemicelulolíticas no extrato parcialmente purificado. A concentração de carboximetilcelulase (CMCase) e  $\beta$ -glicosidase encontrada foi de 340 e 38 U/mL, respectivamente. O aumento na produção de glicose observada na **Figura 3.4**, pode ter ocorrido devido à hidrólise das arabinoxilanas WU-AX e também da degradação de alguma celulose contaminante presente nas arabinoxilanas isoladas da farinha de trigo, já que o extrato contém enzimas capazes de hidrolisar este homopolissacarídeo. O extrato produzido pelo *T. aurantiacus* CBMAI 756 não apresenta enzimas amilolíticas ( $\alpha$ -amilase e glucoamilase) (OLIVEIRA, et al, 2010). Deste modo, o aumento na concentração de glicose não pode ser devido à degradação de algum amido contaminante na amostra.



**Figura 3.3.** Perfil cromatográfico obtido por HPAEC-PAD da degradação das WU-AX (A) incubadas com xilanase a 70°C em diferentes tempos. A: arabinose; X<sub>1</sub>: xilose; X<sub>2</sub>: xilobiase; X<sub>3</sub>: xilotriose e X<sub>4</sub>: xilotetraose. Coluna analítica PA-100.



**Figura 3.4.** Perfil cromatográfico obtido por HPAEC-PAD da degradação das WU-AX (A) incubadas com xilanase a 70°C em diferentes tempos. A: arabinose; G<sub>1</sub>: glicose; X<sub>1</sub>: xilose. Coluna analítica PA-1.

As **Tabelas 3.12 e 3.13** apresentam as concentrações dos produtos obtidos após a degradação das WU-AX com 35U de xilanase por 48 h a 32°C e 70°C, respectivamente. As concentrações de xilose (X<sub>1</sub>), xilobiose (X<sub>2</sub>) e xilotriose (X<sub>3</sub>) aumentaram com o tempo de incubação, indicando a atividade da enzima sobre este substrato. Após 24 h de hidrólise a concentração da xilotriose reduziu, enquanto um aumento de X<sub>1</sub> e X<sub>2</sub> foi observado, sugerindo a despolimerização de X<sub>3</sub>. Com relação à xilotetose (X<sub>4</sub>), sua concentração aumentou nas primeiras duas horas de incubação a 32 °C e a 70 °C, mas após esse período houve uma discreta queda. [Swennen et al. \(2005\)](#) trabalhando com xilanase termofílica de *Aspergillus aculeatus* e usando como substrato as WU-AX isoladas de farinha, detectaram xilooligosacarídeos com grau de polimerização de até 6.

**Tabela 3.12.** Produtos obtidos da degradação das arabinoxilanas insolúveis (WU-AX), pela xilanase (35U), a temperatura de 32°C durante 48h, detectados por HPAEC-PAD.

		(µg/mL)							
	Controle	0,5 hora	1 hora	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas	24 horas	48 horas
X1	nd	1,09 ± 0,11	1,62 ± 0,16	2,84 ± 0,08	7,35 ± 0,17	9,55 ± 0,28	10,70 ± 0,13	17,69 ± 0,19	27,23 ± 0,28
X2	nd	15,35 ± 0,40	20,13 ± 0,01	22,27 ± 0,07	37,80 ± 0,11	41,06 ± 0,09	46,68 ± 0,29	72,67 ± 0,32	115,54 ± 0,24
X3	nd	2,75 ± 0,18	3,77 ± 0,02	4,20 ± 0,02	7,75 ± 0,01	8,84 ± 0,01	9,77 ± 0,03	10,18 ± 0,07	8,59 ± 0,03
X4	nd	nd	1,32 ± 0,08	1,69 ± 0,01	1,34 ± 0,01	1,17 ± 0,24	0,84 ± 0,03	1,19 ± 0,08	1,59 ± 0,03

X<sub>1</sub>: xilose; X<sub>2</sub>: xilobiose; X<sub>3</sub>: xilotriose e X<sub>4</sub>: xilotetraose

\* Não detectado

**Tabela 3.13.** Produtos obtidos da degradação das arabinoxilanas insolúveis (WU-AX), pela xilanase (35U), a temperatura de 70°C durante 48h, detectados por HPAEC-PAD.

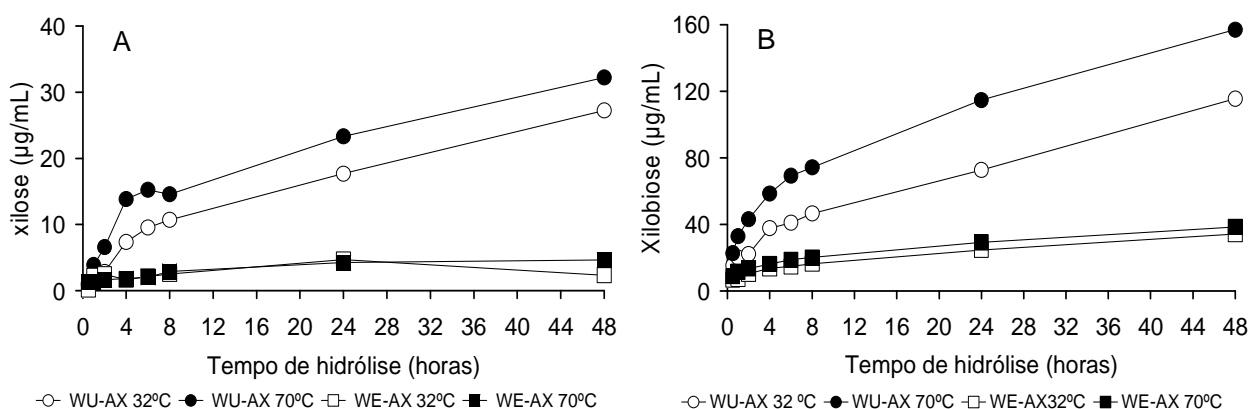
		(µg/mL)							
	Controle	0,5 hora	1 hora	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas	24 horas	48 horas
X1	nd	0,85 ± 0,02	3,88 ± 0,13	6,56 ± 0,20	13,83 ± 1,68	15,24 ± 0,24	14,58 ± 0,97	23,31 ± 0,68	32,22 ± 0,56
X2	nd	22,76 ± 0,11	32,98 ± 0,02	43,09 ± 0,04	58,62 ± 0,10	69,21 ± 0,05	74,33 ± 0,08	114,72 ± 0,32	157,04 ± 0,22
X3	nd	5,35 ± 0,18	8,11 ± 0,01	11,24 ± 0,12	14,01 ± 0,02	15,02 ± 0,02	15,43 ± 0,03	14,38 ± 0,04	11,16 ± 0,03
X4	nd	2,79 ± 0,05	2,97 ± 0,05	2,99 ± 0,09	1,93 ± 0,02	1,69 ± 0,02	1,82 ± 0,01	0,93 ± 0,02	0,40 ± 0,10

\* Não detectado

X<sub>1</sub>: xilose; X<sub>2</sub>: xilobiose; X<sub>3</sub>: xilotriose e X<sub>4</sub>: xilotetraose.

O perfil de produção dos produtos xilose ( $X_1$ ) e xilobiose ( $X_2$ ) pela ação da xilanase sobre as arabinoxilanas WU-AX e WE-AX durante 48 h está representado na **Figura 3.5**. A produção de xilose (**Figura 3.5 A**) e xilobiose (**Figura 3.5 B**) aumentou progressivamente quando os substratos foram as WU-AX. Após 48 horas de incubação a produção desses carboidratos ainda não tinha alcançado um patamar estacionário. A temperatura não foi um fator determinante para a atividade catalítica, mas a concentração desses produtos foi maior quando a xilanase foi incubada na temperatura de 70°C. Quando o substrato foi WE-AX, a concentração dos mesmos produtos ( $X_1$  e  $X_2$ ) foi consideravelmente menor, e a produção de xilose alcançou um patamar estacionário após 24h de incubação. Neste experimento a temperatura também não influenciou a atividade da enzima. Não se pode esquecer que neste trabalho foi usado um extrato enzimático parcialmente purificado, e desta forma, várias xilanases provavelmente estavam presentes, já que o fungo *T. aurantiacus* se desenvolveu em um meio rico em hemicelulose.

As análises realizadas neste trabalho sugerem que o extrato enzimático é composto principalmente de -1,4-D-xilosidases (EC 3.2.1.37) devido à alta produção de xilose e -1,4-D-endoxilanases (EC 3.2.1.8) devido à produção de xilobiose e oligossacarídeos, e arabinofuronosidases (EC 3.2.1.55) devido à presença de arabinose. A quantificação dos produtos da catálise da xilanase parcialmente purificada de *T. aurantiacus* CBMAI 756 mostrou ainda que a enzima estudada apresenta especificidade pelas arabinoxilanas WU-AX da farinha de trigo (**Figura 3.5**).



**Figura 3.5.** Concentração de xilose (A) e xilobiose (B) obtidos da degradação das arabinoxilanas WU-AX e WE-AX isoladas da farinha de trigo, incubadas a 32°C e 70°C, em função do tempo e detectadas por HPAEC-PAD. WU-AX 32°C (-○-), WU-AX 70°C (-●-), WE-AX 32°C (-□-), WE-AX 70°C (-■-).

A completa degradação das arabinoxilanas (WU-AX e WE-AX) requer uma ação sinérgica de um complexo de enzimas xilanolíticas, uma vez que arabinoxilanas de diferentes fontes exibem uma significativa variação em sua composição e estrutura ([CESAR;](#)

MRSA, 1996; LATIF et al., 2006). Talvez, este seja o provável motivo para o fungo *T. aurantiacus* ter sintetizado um complexo xilanolítico, capaz de retirar a máxima energia do meio de cultura (sabugo de milho), para manter seu metabolismo

De acordo com Courtin; Gelders; Delcour, (2001); Courtin; Delcour, (2002) as xilanases mais adequadas para a panificação são aquelas que atuam principalmente sobre a fração de arabinoxilanas WU-AX, e apresentam uma atuação menos efetiva sobre a fração WE-AX. Isto porque, o mecanismo enzimático proposto para a hidrólise das arabinoxilanas pela xilanase, provoca uma redistribuição das moléculas de água, pela liberação do carbono 4 (C-4) envolvido na ligação glicosídica com a formação de uma hidroxila neste mesmo carbono, resultando em uma maior capacidade de absorção de água pela massa (COURTIN; ROELANTS; DELCOUR, 1999; COURTIN; DELCOUR, 2001; ROUAU; EL-HAYEK; MOREAU, 2001).

As xilanases presentes no extrato enzimático estudado quebraram as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 principalmente das arabinoxilanas WU-AX, promovendo um aumento na elasticidade das massas e no volume específico dos pães, provavelmente pela menor interferência física dos oligossacarídeos originados da degradação das arabinoxilanas na formação do glúten. Segundo Courtin; Roelants; Delcour, 1999; Courtin; Delcour, 2001; Sorensen et al., 2004 as xilanases modificam as arabinoxilanas da farinha promovendo um aumento da estabilidade da massa, melhorando a expansão da mesma durante o forneamento, o que contribui para o aumento do volume dos pães, como observado neste trabalho.

Os principais produtos de reação da xilanase parcialmente purificada de *T. aurantiacus* CBMAI 756 detectados foram xilobiose seguido da xilose. Estes carboidratos são moléculas polihidroxiladas e de baixa massa molecular. Eles não apresentam suas hidroxilas ocupadas com ligações secundárias necessárias à estabilização das moléculas de alta massa molecular. Assim, por serem altamente higroscópicas são capazes de alterar a distribuição das moléculas de água, interferindo no processo de retrogradação da amilopectina e na absorção de água pela massa, como também observado nesse trabalho. A firmeza do miolo provavelmente está associada à retrogradação da amilopectina. Os produtos formados pela ação da xilanase possivelmente influenciou a distribuição da água no pão, causando um desaceleramento da retrogradação da amilopectina durante o período de armazenamento.

### 3.4. Conclusão

Em conclusão, a xilanase parcialmente purificada isolada do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 aumentou significativamente o volume específico do pão. A especificidade das xilanases presentes no extrato enzimático é pelas arabinoxilanas WU-AX. A xilanase aumentou a vida de prateleira dos pães pela redução da firmeza do miolo e

redução da retrogradação da amilopectina durante o armazenamento, podendo ser aplicada como uma enzima antienvelhecimento. O mecanismo para a redução da retrogradação da amilopectina pode ser atribuído a degradação das arabinoxilanas, principalmente as WU-AX, por um complexo xilanolítico que quebra as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 da cadeia principal e xilanases desramificadoras que liberam arabinose e glicose dos pontos de ramificação. Dessa degradação são liberados carboidratos de baixo peso molecular que alteram a distribuição de água na massa e dificultam a retrogradação das moléculas de amilopectina.

### 3.5. Referências

- AACC – **Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists**. 7. ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemistry, v. 3, 2000.
- ADDO, K; XIONG, Y. L; BLANCHARD, S. P. Thermal and dynamic rheological properties of wheat flour fractions. **Food Research International**, v. 34, p. 320-335, 2001.
- ATWELL, W. A. **Wheat flour**. St. Paul: Eagan Press, 2001.
- BLAZEK, J; COPELAND, L. Pasting and swelling properties of wheat flour and starch in relation to amylose content. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 380-387, 2008.
- BRASIL. Portaria nº 8, de 02 de julho de 2005. Aprova o Regulamento Técnico de Identificação e Qualidade da Farinha. Diário Oficial da União, Brasília, 04 de julho de 2005. Seção 1, pt I.
- CABALLERO, P. A; GÓMEZ, 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.
- CAUVAIN, S. P. **Bread making: improving quality**. Washington: Woodhead Publishing Limited, 2007.
- CESAR, T; MRSA, V. Purification and properties of xylanase produced by *Thermomyces lanuginosus*. **Enzymes Microbiology and Technology**, v. 19, p. 289-296, 1996.
- CHU, B. C. H; LEE, H. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 425-441, 2007.
- COLLINS, T; HOYOUX, A; DUTRON, A; GEORIS, J; GENOT, B; DAUVRIN, T; ARNAUT, F; GERDAY, C; FELLER, G. Use of glycoside hydrolase family 8 xylanases in baking. **Journal of Cereal Science**, v. 43, p. 79–84, 2006.
- COURTIN, C. M; GELDERS, G. G; DELCOUR, J. A. The use of two endoxylanases with different substrate selectivity provides insight into the functionality of arabinoxylans in wheat flour breadmaking. **Cereal Chemistry**, v. 78, p. 564–571, 2001.
- COURTIN, C. M; DELCOUR, J. A. Relative activity endoxylanases towards water-extractable and unextractable arabinoxylan. **Journal of Cereal Science**. 33, p. 301–312, 2001.
- COURTIN, C. M; DELCOUR, J. A. Arabinoxilans and endoxylanases in wheat flour bread-making. **Journal of Cereal Science**, v. 35, p. 225-243, 2002.
- COURTIN, C. M; ROELANTS, A; DELCOUR, J. A. Fractionation-reconstitution experiments provide insight into the role of endoxylanases in bread-making. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p.1870- 1877, 1999.
- DA-SILVA, R; LAGO, E. S; MERHEB, C. W; MACCHIONE, M. M; PARK, Y. K; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase on solid-state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 235-241, 2005.

EL-DASH, A. A; CAMARGO, C. O; DIAZ, N. M. **Fundamentos da tecnologia de panificação**. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1990.

ELIASSEN, A. C; GUDMUNDSSON, G; SVENSSON, G. Thermal behaviour of wheat in flour relation to flour quality. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie-Food Science and Technology**, v. 28, p. 227-235, 1995.

ELIASSEN, A. C; LARSSON, K. **Cereals in breadmaking: a molecular colloidal approach**. New York: Marcel Dekker, 2007.

FREDERIX, S. A; VAN, H; COURTIN, C. M; DELCOUR, J. A. Water-extractable and water-unextractable arabinixylans affect gluten agglomerataion behavior during wheat flour gluten-starch separation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v .52, p. 7950-7956, 2004.

GOESAERT, H; BRIJS, K; VERAVERBEKE, W. S; COURTIN, C. M; GEBRUERS, K; DELCOUR, J. A. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. **Food Science & Technology**, v.16, p.12-30, 2005.

GRAY, J. A; BEMILLER, J. N. Bread staling: molecular basis and control. **Comprehensive Reviews in Food Science and food Safety**, v. 2, p. 1-21, 2003.

GRUPPEN, H; KORMELINK, F. J. M; VORAGEN, A. G. J. Water-unextractable cell-wall material from wheat-flour .3. A structural model for arabinoxylans. **Journal of Cereal Science**, v. 18, p. 111-128, 1993,

HAROS, M; ROSELL, C. M; BENEDITO, C. Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling. **European Food Research and Technology**, v. 215, p. 425-430, 2002.

HE. H, HOSENEY, R. C. Changes in bread firmness and moisture during long-term storage. **Cereal Chemistry**, v. 67, p. 603-605, 1990.

HOSENEY, R. C. Fuctional properties of pentosans in baked foods. **Food Technology**, v. 38, p. 114-117, 1984.

HOSENEY, R.C. **Principios de Ciencia y Tecnología de los Cereals**. In: HOSENEY, R. C. Zaragoza-España: Acribia, S. A, 1991.

HORWITZ, W. **Official methods of analysis of AOAC International**. 14. ed. Gaithersburg: Maryland, Método 985.29, p. 97-98, 2005.

JIANG,Z; LI, X; YANG, S; LI, L; TAN, S. Improvement of the breadmaking quality of wheat flour by the hyperthermophilic xylanase B from *Thermotoga maritima*. **Food Research International**, v. 38, p.37-43, 2005.

JIANG, Z; BAIL, A. L; WU, A. Effect of the thermostable xylanase B (XynB) from *Thermotoga maritima* on the quality of frozen partially baked bread. **Journal of Cereal Science** (2007), doi:10.1016/j.jes.2007.03.013.

KALOGERIS, E; CHRISTAKOPOULOS, P; VRSANSKÁ, M; KEKOS, D; BIELY, P; MACRIS, B. J. Catalytic properties of the endoxylanase I from *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 491–501, 2001.

KESKIN, S. Ö; SUMNU, G; SAHIN, S. Usage of enzymes in a novel baking process. **Nahrung/Food**, v. 48, p. 156-160, 2004.

KULKARNI, N; SHENDYE, A; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 411-456, 1999.

LAFTI, F; ASGHER, M; SALEEM, A; AKRAM, R; LEGGE, R. Purification and characterization of xylanase produced by *Chaetomium thermophile* NIBGE. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 22, p. 45-50, 2006.

- LAURIKAINEN, T; HÄRKÖNEN, H; AUTIO, K; POUTANEN, K. Effects of enzymes in fibre-enriched baking. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 239-249, 1998.
- LI, K; AZADI, P; COLLINS, R; TOLAN, J; KIM, J; ERIKSSON, K. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 27, p. 89-94, 2000.
- LOOSVELD, A. M; GROBET, P. J; DELCOUR, J. A. Contents and structural features of water-extractable arabinogalactan in wheat flour fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1998-2002, 1997.
- MALEKI, M; HOSENEY, R. C; MATTERN, P. J. Effects of loaf volume, moisture content, and protein quality on the softness and staling rate of bread. **Cereal Chemistry**, v. 57, p. 138-140, 1980.
- MARTIN, M. L.; ZELEZNAK, K. J; HOSENEY, R. C. A mechanism of bread firming. I. Role of starch swelling. **Cereal Chemistry**, v. 68, p. 503-507, 1991.
- MARTIN, M. L.; HOSENEY, R. C. A mechanism of bread firming. II. Role of starch hydrolyzing enzymes. **Cereal Chemistry**, v. 68, p. 498-503, 1991.
- MARTINEZ-ANAYA, M. A; JIMÉNEZ, T. Functionality of enzymes that hydrolyse starch and non-starch polysaccharide in breadmaking. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A-Food Research Technology**, v. 205, p. 209-214, 1997.
- McCLEARY, B. V. Enzymatic modification of plant polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 8, p. 349-354, 1986.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- NARUENARTWONGSAKUL, S; CHINNAN, M. S; BHUMIRATANA, S; YOOVIDHYA, T. Pasting characteristics of wheat flour-based batters containing cellulose ethers. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie-Food Science and Technology**, v. 37, p. 489-495, 2004.
- PASTELL, H; TUOMAINEN, P; VIRKKI, L; TENKANEN, M. Step-wise enzymatic preparation and structural characterization of singly and doubly substituted arabinoxyl-oligosaccharides with non-reducing end terminal branches. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 3049-3057, 2008.
- PATEL, B. K; WANISKA, R. D; SEETHARAMAN, K. Impact of different baking processes on bread firmness and starch properties in breadcrumb. **Journal of Cereal Science**, v. 42, p. 173-184, 2005.
- PIAZZA, L; MASI, P. Moisture redistribution throughout the bread loaf during staling and its effect on mechanical properties. **Cereal Chemistry**, v. 72, p. 320-325, 1995.
- PRIMO-MARTIN, C; VAN NIEUWENHUIJZEN, N. H; HAMER, R. J; VAN VLIET, T. Crystallinity changes in wheat starch during the bread-making process: Starch crystallinity in the bread crust. **Journal of Cereal Science**, v. 45 p. 219-226, 2007.
- PIZZINATTO, A. Qualidade da farinha de trigo: conceito, fatores determinantes e parâmetros de avaliação e controle. **Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos**, 1997.
- PIZZINATTO, A; ORMENESE, R. C. S. C. Condições adequadas para a produção de pães, massa e biscoitos. **Campinas: Centro de Tecnologia de Cereais e Chocolate**, 1996.
- POMERANZ, Y. **Wheat: chemistry and technology**. 3. ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemistry, v. 1, 1988.
- PRABHASANKAR, P; INDRANI, D; JYOTSNA, R; RAO, G. V. Influence of enzymes on rheological, microstructure and quality characteristics of parotta – na unleavened Indian flat bread. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 2128-2134, 2004.

PROSCKY, L; ASP, N-G; FURDA, I; DEVRIES, J. W; SCHWEIZER, T. F; HARLAND, B. F. Determination of total dietary fiber in foods, food products and total diets. **Journal Official Analyst Chemistry**, v. 67, p. 1044-1052, 1984.

PUPPO, M. C; CALVELO, A; AÑÓN, M. C. Physicochemical and rheological characterization of wheat flour dough. **Cereal Chemistry**, v. 82, p. 173-181, 2005.

RANTANEN, H; VIRKKI, L; TUOMAINEN, P; KABEL, M; SCHOLS, H; TENKANEN. Preparation of arabinoxyllobiose from rye xylan using family 10 *Aspergillus aculeatus* endo-1,4,β-D-xylanase. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 350-359, 2007.

RIBOTTA, P. D; BAIL, A. LE. Thermo-physical assessment of bread during staling. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie-Food Science and Technology**, v. 40, p. 879-884, 2007.

ROUAU, X; EL-HAYEK, M. L; MOREAU, D. Effect of an enzyme preparation containing pentosanases on the bread-making quality of flours in relation to change in pentosan properties. **Journal of Cereal Science**, v.78, p. 564-571, 2001.

SHAIKH, I. M; GHODKE, S. K; ANANTHANARAYAN, L. Staling of chapatti Indian unleavened flat bread. **Food Chemistry**, v. 101, p. 113-119, 2007.

SHAH, A. R; SHAH, R. K; MADAMWAR, D. Improvement of the quality of whole wheat bread by supplementation of xylanase from *Aspergillus foetidus*. **Bioresouce Technology**, v. 97, p. 2047-2053, 2006.

SAHLSTRØM, S; BAEVRE, A. B; BRÅTHEN, E. Impact of starch properties on hearth bread characteristics. I. Starch in wheat flour. **Journal of Cereal Science**, v. 37, p. 275-284, 2003.

SLUIMER, P. **Principles of breadmaking: functionality of raw materials and process steps**. St. Paul: American Association of Cereal Chemistry, 2005.

SORENSEN, J.F. et al. Potential role of glycosidase inhibitors in industrial biotechnological applications. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1696, p. 275-287, 2004.

SWENNEN, K; COURTINA, C.M; BRUGGEN, B. V. D; VANDECASTEELEB, C; DELCOUR, J. A. Ultrafiltration and ethanol precipitation for isolation of arabinoxyloligosaccharides with different structures. **Carbohydrate Polymers**, v 62, p. 283–292, 2005.

THOMAS, D. J; ATWELL, W. A. **Starch**. 1. ed. St. Paul: Eagan Press, 1999.

ZOBEL, H. F; KULP, K. The staling mechanism. IN: HEBEDA, R.E; ZOBEL, H. F. **Baked goods freshness**. New York. Marcel Dekker, p. 1-64, 1996.

CAPÍTULO IV  
APLICAÇÃO DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE (CGTase) NA PRODUÇÃO DE  
PÃES

SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>102</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>103</b>
<b>4.1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>104</b>
<b>4.2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>105</b>
4.2.1. MATERIAL .....	105
4.2.2. MÉTODOS .....	106
4.2.2.1. <b>Ação da CGTase nas características reológicas e nas propriedades térmicas da farinha de trigo.....</b>	<b>106</b>
4.2.2.1.1. Propriedades farinográficas.....	106
4.2.2.1.2. Propriedades extensográficas .....	106
4.2.2.1.3. Propriedades de pasta.....	106
4.2.2.1.4. Propriedades térmicas.....	106
4.2.2.2. <b>Produção de pão.....</b>	<b>106</b>
4.2.2.2.1. Método de panificação.....	106
4.2.2.2.2. Avaliação do volume e pH da massa .....	107
4.2.2.2.3. Avaliação do volume do pão .....	107
4.2.2.3. <b>Estudo do envelhecimento do pão .....</b>	<b>107</b>
4.2.2.3.1. Conteúdo de água do miolo e da crosta do pão .....	107
4.2.2.3.2. Avaliação da firmeza do miolo do pão .....	107
4.2.2.3.3. Retrogradação da amilopectina do miolo do pão.....	107
4.2.2.4. <b>Estudo da suscetibilidade enzimática do amido da farinha de trigo, frente à ação da CGTase .....</b>	<b>107</b>
4.2.2.4.1. Isolamento do amido da farinha de trigo .....	107
4.2.2.4.2. Ação da CGTase sobre o amido isolado da farinha de trigo.....	108
4.2.2.5. <b>Análise dos produtos da reação da CGTase sobre o amido de trigo .....</b>	<b>108</b>
4.2.2.5.1. Análise da produção de ciclodextrinas (CDs).....	108
4.2.2.5.2. Método dextrinizante .....	108
4.2.2.5.3. HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência) .....	109
4.2.2.5.4. Análise da produção de maltooligossacarídeos.....	109

4.2.2.6.	<b>Análise de ciclodextrinas e maltooligossacarídeos formados no pão pela ação da CGTase</b>	110
4.2.2.6.1.	Concentração de ciclodextrinas e maltooligossacarídeos do pão	110
4.2.2.6.2.	Análise das ciclodextrinas formadas no pão	110
4.2.2.6.3.	Análise de maltooligossacarídeos formados no pão	110
4.2.2.7.	<b>Análise estatística</b>	110
4.3.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	110
4.3.1.	<b>AÇÃO DA CGTase NAS CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS E TÉRMICAS DA FARINHA DE TRIGO</b>	110
4.3.1.1.	<b>Propriedades farinográficas</b>	111
4.3.1.2.	<b>Propriedades extensográficas</b>	111
4.3.1.3.	<b>Propriedades de pasta</b>	112
4.3.1.4.	<b>Propriedades térmicas</b>	114
4.3.2.	<b>AÇÃO DA CGTase NAS CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DA MASSA E DO PÃO</b>	115
4.3.2.1.	<b>Avaliação do volume e pH da massa</b>	115
4.3.2.2.	<b>Avaliação do volume do pão</b>	116
4.3.3.	<b>AÇÃO DA CGTase NO ENVELHECIMENTO DO PÃO</b>	117
4.3.3.1.	<b>Conteúdo de água do miolo e da crosta do pão</b>	117
4.3.3.2.	<b>Avaliação da firmeza do miolo do pão</b>	119
4.3.3.3.	<b>Retrogradação da amilopectina do miolo do pão</b>	120
4.3.4.	<b>ESTUDO DA SUSCETIBILIDADE ENZIMÁTICA DO AMIDO DE TRIGO, FRENTE À AÇÃO DA CGTase</b>	121
4.3.4.1.	<b>Análise dos produtos de reação da CGTase sobre o amido isolados da farinha de trigo, por HPAEC-PAD</b>	121
4.3.5.	<b>AÇÃO DA CGTase DURANTE O PROCESSO DE PANIFICAÇÃO</b>	126
4.3.5.1.	<b>Análise de maltooligossacarídeos e ciclodextrinas formados no pão pela ação da CGTase</b>	126
4.4.	<b>CONCLUSÕES</b>	129
4.5.	<b>REFERÊNCIAS</b>	130

## LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1.	Perfil viscoamilográfico da farinha de trigo adicionada de CGTase parcialmente purificada.....	113
Figura 4.2.	Efeito da CGTase parcialmente purificada sobre o volume específico do pão.....	117
Figura 4.3.	Efeito da CGTase parcialmente purificada sobre o conteúdo de água do miolo (A) e da crosta (B) durante o armazenamento do pão a 4 °C.....	118
Figura 4.4.	Efeito da CGTase parcialmente purificada sobre a coloração da crosta do pão.....	119
Figura 4.5.	Efeito da CGTase parcialmente purificada sobre a firmeza do miolo durante o armazenamento do pão a 4 °C.....	119
Figura 4.6.	Efeito da CGTase parcialmente purificada sobre a entalpia de retrogradação do miolo do pão durante o armazenamento a 4°C.....	121
Figura 4.7.	Produção de CDs pela ação da enzima CGTase parcialmente purificada sobre o amido de trigo gelatinizado.....	123
Figura 4.8.	Perfil cromatográfico obtido por HPAEC-PAD da degradação do amido de trigo incubado com CGTase parcialmente purificada a 55°C em diferentes tempos.....	125
Figura 4.9.	Perfil cromatográfico obtido por HPAEC-PAD dos maltooligossacarídeos presentes nos pães controles e adicionados de GTase parcialmente purificadas .....	128

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Efeito da CGTase parcialmente purificada sobre as características farinográficas da farinha de trigo.....	111
Tabela 4.2. Efeito da CGTase parcialmente purificada sobre as características extensográficas da farinha de trigo .....	112
Tabela 4.3. Efeito da CGTase parcialmente purificada sobre as propriedades de pasta <sup>1</sup> da farinha de trigo.....	113
Tabela 4.4. Efeito da CGTase parcialmente purificada sobre as propriedades térmicas de gelatinização <sup>1</sup> da farinha de trigoa. ....	114
Tabela 4.5. Efeito da CGTase parcialmente purificada sobre a entalpia de retrogradação <sup>1</sup> da farinha durante o armazenamento a 4°C .....	115
Tabela 4.6. Efeito da CGTase parcialmente purificada sobre o volume e pH da massa.....	116
Tabela 4.7. Produtos obtidos da degradação do amido de trigo gelatinizado (2,5% p/v) pela ação da CGTase parcialmente purificada, detectados por HPLC .....	123
Tabela 4.8. Produtos obtidos da degradação do amido de trigo, pela CGTase parcialmente purificada a 55°C durante 48h, detectados por HPAEC-PAD.....	126
Tabela 4.9. Produtos produzidos no miolo dos pães durante o processo de panificação, pela ação da CGTase, detectados por HPAEC-PAD .....	129

## 4.1. Introdução

Várias alterações indesejáveis ocorrem durante o armazenamento dos pães, levando a perda da qualidade do produto. Essas alterações são facilmente reconhecidas pelos consumidores, e está além da proliferação de microrganismos indesejáveis. Durante o envelhecimento, o pão perde seu frescor e endurece, estando este processo intimamente relacionado à migração de água e transformações ocorridas no amido, principalmente pela retrogradação da amilopectina (HOSENEY, 1984; GOESAERT et al., 2005).

O envelhecimento do pão normalmente é avaliado pela determinação da firmeza do miolo, mas também é influenciado pelo volume do pão e pela estrutura do miolo (GOESAERT et al., 2005). Alguns pesquisadores têm sugerido que a firmeza do miolo pode ser influenciada por interações amido-glúten (MARTIN, ZELEZNAK, HOSENEY, 1991). No entanto, a maior parte dos trabalhos sobre envelhecimento de pães considera a firmeza do miolo como o resultado da retrogradação da amilopectina, principalmente em função da formação de estruturas em dupla hélice, que aumentam as regiões cristalinas do amido retrogradado (ZOBEL; KULP, 1996). A retrogradação resulta da formação de agregados cristalinos ou reassociação das moléculas de amilose e amilopectina com a liberação de água num fenômeno denominado de sinérese (THOMAS; ATWELL, 1999). Outros fatores, além do período de armazenamento, influenciam o comportamento de retrogradação da amilopectina como: temperatura de armazenamento, estrutura desse polissacarídeo e outros componentes presentes (ELIASSON, 1986).

Muito tem sido feito no sentido de minimizar os efeitos negativos que o processo de envelhecimento causa durante o armazenamento dos pães. O uso de emulsificantes (Stampfli; Nersten, 1995), hidrocolóides (Guarda et al., 2004), e mais recentemente a utilização de enzimas têm se destacado como um caminho promissor para a melhoria da qualidade de produtos panificáveis. Entre as enzimas amplamente estudadas estão aquelas que degradam o amido.

A ciclodextrina glicosiltransferase (EC 2.4.1.19, CGTase) é a única enzima capaz de catalisar a reação de ciclização da molécula de amido e/ou da molécula de maltodextrina linear produzindo ciclodextrinas (CDs) (BLACKWOOD; BUCKE, 2000). Esta enzima também catalisa outras três reações: (1) reação de acoplamento que é reversa a ciclização, onde as ciclodextrinas são clivadas e transferidas a um receptor linear (dextrinas lineares); (2) a reação de desproporcionamento no qual dois oligossacarídeos lineares são convertidos em dois oligossacarídeos lineares de tamanhos diferentes (Van Der Veen, 2000); e (3) a reação de hidrólise (BLACKWOOD; BUCKE, 2000; JEMLI et al., 2007).

As Enzimas amilolíticas que hidrolisam moléculas de amilose e amilopectina em moléculas de menor massa molecular, levam a uma retrogradação limitada e/ou mais lenta dessas moléculas (BOYLE; HEBEDA, 1990).

Estudos sobre adição de CGTase no pão de farinha de arroz, melhoraram o volume específico dos pães e reduziram a firmeza do miolo e também a retrogradação da amilopectina durante o armazenamento (LEE et al., 2002; JEMLI et al., 2007).

Devido à sua estrutura cíclica, as ciclodextrinas, também podem formar complexos de inclusão com uma variedade de compostos, dentre eles os voláteis, e assim elas podem ser usadas para capturar aromas (YU; AOKI; MISAWA, 1988). A retenção do aroma em produtos alimentícios possivelmente aumentaria a sua aceitação pelos consumidores durante o período de armazenamento.

A vantagem do uso da CGTase adviria de sua característica singular em produzir ciclodextrinas. Os estudos da influência desses carboidratos no processo de envelhecimento dos pães ainda são recentes e consequentemente incompletos.

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência da CGTase parcialmente purificada produzida pela bactéria *Bacillus clausii* E16 no processo de envelhecimento do pão de trigo, identificar os produtos liberados pela ação desta enzima e relacionar esses produtos aos efeitos da enzima no pão.

## **4.2. Material e Métodos**

### **4.2.1. Material**

Farinha de trigo obtida da moagem de grãos duros, adequada para produção de pão, gentilmente doada pelo moinho Sete Irmãos (Uberlândia, Brasil) foi usada neste trabalho. Outros ingredientes para confecção dos pães foram obtidos do comércio local (São José do Rio Preto, Brasil). Todos os outros reagentes utilizados foram puros para análise.

A enzima utilizada neste estudo foi a ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) produzida por meio de fermentação submersa pela bactéria *Bacillus clausii* E16, parcialmente purificada. O extrato enzimático estava livre das enzimas amilolíticas  $\alpha$ -amilase e glucoamilase.

Os padrões cromatográficos de glicose, dos maltooligossacarídeos (G2-G7),  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrina foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, USA) todos grau HPLC.

## **4.2. Métodos**

### **4.2.2.1. Ação da CGTase nas características reológicas e nas propriedades térmicas da farinha de trigo**

#### **4.2.2.1.1. Propriedades farinográficas**

As características reológicas e as propriedades térmicas da farinha de trigo controle e adicionadas de 15U e 30U de CGTase parcialmente purificada por 100 g de farinha foram determinadas utilizando as mesmas metodologias usadas para o estudo com a xilanase.

Esta análise foi realizada de acordo com o método descrito em 3.3.2.4.1

#### **4.2.2.1.2. Propriedades extensográficas**

Esta análise foi realizada de acordo com o método descrito em 3.3.2.4.2.

#### **4.2.2.1.3. Propriedades de pasta**

Esta análise foi realizada de acordo com o método descrito em 3.3.2.4.3.

#### **4.2.2.1.4 Propriedades térmicas**

Esta análise foi realizada de acordo com o método descrito em 3.3.2.4.4.

### **4.2.2.2. Produção de pão**

#### **4.2.2.2.1. Método de panificação**

A quantidade de água adicionada foi determinada de acordo com a absorção de água da farinha determinada em farinógrafo (Brabender) e descrita no laudo técnico da farinha, fornecido pelo Moinho Sete Irmãos. A ciclodextrina glicosiltransferase nas concentrações de 15U e 30U/100g de farinha foi adicionada na água a temperatura ambiente. A enzima foi dissolvida na água para garantir o amplo acesso em toda a massa.

O método de panificação foi realizado de acordo com o método descrito em 3.3.2.5.1.

#### **4.2.2.2.2. Avaliação do volume e pH da massa**

Esta análise foi realizada de acordo com o método descrito em 3.3.2.5.2.

#### **4.2.2.2.3. Avaliação do volume do pão**

Esta análise foi realizada de acordo com o método descrito em 3.3.2.5.3.

#### **4.2.2.3. Estudo do envelhecimento do pão**

Para o estudo do envelhecimento, os pães após o forneamento foram resfriados a temperatura ambiente por 2 horas antes de serem armazenados em embalagens de polietileno e estocados a 4°C por 10 dias. As análises do conteúdo de água, firmeza e de retrogradação da amilopectina dos pães controle e adicionados de CGTase parcialmente purificada descritas abaixo foram realizadas nos dias 0, 3, 5, 7 e 10. Durante esse tempo, os pães foram armazenados a uma temperatura de 4°C. Os pães foram mantidos à temperatura ambiente por 30 minutos antes de serem analisados.

##### **4.2.2.1.1. Conteúdo de água do miolo e da crosta do pão**

Esta análise foi realizada de acordo com o método descrito em 3.3.2.6.1.

##### **4.2.2.3.2. Avaliação da firmeza do miolo do pão**

Esta análise foi realizada de acordo com o método descrito em 3.3.2.6.2.

##### **4.2.2.3.3. Retrogradação da amilopectina do miolo do pão**

Esta análise foi realizada de acordo com o método descrito em 3.3.2.6.3.

#### **4.2.2.4. Estudo da suscetibilidade enzimática do amido da farinha de trigo, frente à ação da CGTase**

##### **4.2.2.4.1. Isolamento do amido da farinha de trigo**

O isolamento do amido foi realizado de acordo com [Wolf, \(1964\)](#). Farinha de trigo (100 g) foi adicionada a 80 mL de água e misturada por 12 minutos em batedeira planetária (Lieme,

BP-12SL, Caxias do Sul, Brasil). A massa descansou por 2 horas em temperatura ambiente. Depois, a mesma foi lavada com 400 mL de água com a ajuda de uma peneira de 70 µm. O amido recuperado foi filtrado para a retirada de farelo e impureza da parede celular presentes na farinha, para posteriormente ser centrifugado a 2300g/10 minutos. Do precipitado, uma camada escura denominada de *squeegee fraction* (SQF), que contém hemiceluloses, proteínas e impurezas foi retirada manualmente. O amido foi ressuspensionado em água, centrifugado e novamente a camada de SQF foi retirada. Este processo de purificação foi repetido três vezes para obtenção de um amido de boa qualidade. O amido foi seco em estufa com circulação de ar na temperatura de 40°C.

#### **4.2.2.4.2. Ação da CGTase sobre o amido isolado da farinha de trigo**

O amido foi incubado com CGTase isolada da bactéria *Bacillus clausii* E16 para hidrólise. Amido, pré gelatinizado por 10 minutos a 100°C (2,5 g/100 mL) em tampão acetato 0,1 M pH 5,0, adicionado de 30U de CGTase foi incubado a 55°C por 0,5, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas sob agitação constante. Amostras controle (sem CGTase) foram preparadas. Após os períodos de incubação, as amostras foram centrifugadas a 9.000g/10 minutos e o sobrenadante recuperado. Posteriormente o sobrenadante foi fervido para a inativação da CGTase pelo calor, e novamente o mesmo foi centrifugado como descrito acima. Os produtos da reação da CGTase foram congelados, para posteriormente serem analisados por cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD), por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e por ensaios enzimáticos.

#### **4.2.2.5. Análise dos produtos da reação da CGTase sobre o amido de trigo**

##### **4.2.2.5.1. Análise da produção de ciclodextrinas (CDs)**

Um método enzimático foi usado para verificar a atividade catalítica da CGTase sobre o amido de trigo. O método de iodo ou dextrinizante que determina a taxa de hidrólise do amido. A atividade dextrinizante foi determinada de acordo com método proposto por [Fuwa \(1954\)](#) e [Pongsawasdi e Yagisawa \(1987\)](#), com modificações.

##### **4.2.2.5.2. Método dextrinizante**

Uma alíquota de 0,4 mL do hidrolisado recebeu 4,0 mL HCl 0,2M, 0,5 mL de solução de iodo (0,30% KI e 0,03% I<sub>2</sub>) e 10 mL de água. O controle foi preparado conforme o processo descrito, utilizando hidrolisado do tempo zero (controle). A absorbância foi determinada pela

leitura espectrofotométrica a 700 nm. Pela mudança da intensidade da cor azul do complexo iodo-amido foi determinada a porcentagem de dextrinização do amido pela CGTase.

#### **4.2.2.5.3. HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)**

As amostras obtidas em 4.2.2.4.2. foram filtradas em membrana 0,22 µm Milllex-GV (Milipore, USA) e uma alíquota de 10 µL foi analisada num sistema de cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (Jascon PU-980 intelligent, USA) de acordo com [Gujral et al. \(2003\)](#). O HPLC foi equipado com um forno para coluna - STH 585 (Dionex, Sunnyvale, USA), uma coluna analítica Zorbax-NH2, carboidrate (4,6 mm x 250 mm, 5 µm, Aligent Technologies, Santa Clara, USA) e com um índice de refração (Shodex RI-72). O gradiente isocrático de eluição durante a corrida foi acetonitrila/água (65:35) com um fluxo de 1 mL/minuto a 40°C. As ciclodextrinas α-CD, β-CD e γ-CD foram usadas como referência. Os dados foram coletados utilizando-se o software Varian Star, versão 4.0. As amostras foram analisadas em duplicata. A porcentagem de amido convertido em CDs foi calculada pela razão entre a quantidade de CD total (g) e quantidade de amido (g), multiplicado por 100.

#### **4.2.2.5.4. Análise da produção de maltooligossacarídeos**

As amostras obtidas em 4.2.2.4.2 foram filtradas em membrana 0,22 µm Milllex-GV (Milipore, USA) e uma alíquota de 20 µL foi analisada num sistema de cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção de pulso amperométrico - HPAEC-PAD (Dionex ICS-3000, Sunnyvale, USA) equipado com amostrador automático AS 40 de acordo com [Koizumi; Fukuda; Hizukuri \(1991\)](#), com modificações. A forma de onda empregada foi 'standard quadruple' com os seguintes pulsos de potenciais e durações:  $E_1 = 0,10 \text{ V}$  ( $t_1 = 0,40 \text{ s}$ );  $E_2 = -2,00 \text{ V}$  ( $t_2 = 0,02 \text{ s}$ );  $E_3 = 0,60 \text{ V}$  ( $t_3 = 0,01 \text{ s}$ );  $E_4 = -0,10 \text{ V}$  ( $t_4 = 0,06 \text{ s}$ ). Os monossacarídeos e oligossacarídeos obtidos na hidrólise do amido foram separados usando uma pré-coluna CarboPac PA-100 e uma coluna analítica CarboPac PA-100 (2 x 250mm, Dionex, Sunnyvale, USA) com um de fluxo de 0,8 mL/minuto a 40°C. Os eluentes foram preparados com água deionizada ultra pura e degaseificados com N<sub>2</sub>; os eluentes utilizados na corrida foram: (A): 200 mM NaOH, (B) e (C): água deionizada ultra pura (18 mΩ.cm) e (D): 1 M acetato de sódio/ 300 Mm NaOH. Antes da injeção da amostra a coluna foi estabilizada com um gradiente isocrático de eluição com (58,5% A; 19,5% B; 11% C e 11% D). A corrida foi realizada com um gradiente linear de eluição de 0-10,0 min. (51,5% A; 13,5% B; 17,5% C e 17,5% D). Uma etapa de limpeza foi realizada durante 5 min. com 50% do eluente C e 50% D no final de cada corrida. Após a corrida a coluna foi estabilizada por 10 min. com as condições iniciais (58,5% A; 19,5% B; 11% C e 11% D), antes da próxima injeção. Padrões cromatográficos com DP 1-7 (G1-G7)

foram usados como referência. Os dados foram coletados utilizando-se o software Chromeleon, versão 6.8 (Dionex, USA). As amostras foram analisadas em duplicata

#### **4.2.2.6. Análise de ciclodextrinas e maltooligossacarídeos formados no pão pela ação da CGTase**

##### **4.2.2.6.1. Concentração de ciclodextrinas e maltooligossacarídeos do pão**

As ciclodextrinas e maltooligossacarídeos do miolo dos pães adicionados de CGTase foram concentrados de acordo com [Lee et al. \(2002\)](#). Miolos de pães foram pesados (10 g) e hidratados com 100 mL de água destilada e agitados vigorosamente por 1 hora e posteriormente centrifugados a 15.000g por 20 minutos. A água do sobrenadante (25 mL) foi retirada com o auxílio de um liofilizador (Thermo Savant - Micro Modulyo, New York, USA) acoplado a uma bomba de pressão (Savant VLP 200). A amostra liofilizada foi diluída com 5 mL de água destilada e congelada para as análises de maltooligossacarídeos (HPAEC-PAD) e ciclodextrinas (HPLC).

##### **4.2.2.6.2. Análise das ciclodextrinas formadas no pão**

Esta análise foi realizada de acordo com o método descrito em 4.2.2.5.3.

##### **4.2.2.6.3. Análise de maltooligossacarídeos formados no pão**

Esta análise foi realizada de acordo com o método descrito em 4.2.2.5.4.

##### **4.2.2.7. Análise estatística**

Esta análise foi realizada de acordo com o método descrito em 3.3.2.8.

#### **4.3. Resultados e discussão**

##### **4.3.1. Ação da CGTase nas características reológicas e térmicas da farinha**

Para a determinação das concentrações de CGTase usadas neste trabalho, testes preliminares, usando diferentes concentrações de enzimas na produção de pães foram realizados. Os dados a partir da avaliação do volume específico do pão foram usados para determinar as melhores concentrações de CGTase. Ficou estabelecida as concentrações de

15U e 30U CGTase/100 g de farinha. Concentrações maiores foram testadas, mas descartadas devido à redução do volume dos pães em relação ao controle.

#### 4.3.1.1. Propriedades farinográficas

Os parâmetros farinográficos das farinhas controle e das adicionadas de CGTase parcialmente purificada estão representados na **Tabela 4.1**.

A farinha controle apresentou porcentagem de absorção de água, estabilidade, índice de tolerância a mistura (I.T.M) e tempo de desenvolvimento específicos de farinha forte.

Não houve alteração na absorção de água pela farinha quando esta foi adicionada de CGTase. Com relação ao tempo de desenvolvimento houve uma leve redução quando 15U de CGTase foi usada e um leve aumento quando 30U de CGTase foi adicionada (**Tabela 4.1**).

A estabilidade das massas adicionadas de CGTase aumentaram, sendo que a farinha adicionada de 30U de CGTase apresentou estabilidade de farinha muito forte.

Com relação ao índice de tolerância a mistura, houve uma pequena redução para as massas adicionadas de CGTase em relação ao controle (**Tabela 4.1**).

**Tabela 4.1.** Efeito da CGTase parcialmente purificada sobre as características farinográficas da farinha de trigo.

<i>Farinha</i>	<i>Absorção (%)</i>	<i>Tempo de desenvolvimento (min)</i>	<i>Estabilidade (min)</i>	<i>Índice de tolerância a mistura (UF)</i>
<i>Controle</i>	60,5	12,0	9,5	30
<i>15U CGTase*</i>	60,0	11,5	14,2	20
<i>30U CGTase*</i>	60,8	13,0	17,5	20

\* (U/100g farinha de trigo).

Os dados farinográficos apresentados, mostraram que a CGTase melhorou as características reológicas da massa pelo aumento pronunciado na estabilidade da mesma.

#### 4.3.1.2. Propriedades extensográficas

As características extensográficas estão relacionadas à qualidade e quantidade das proteínas formadoras do glúten presentes na farinha. A glutenina geralmente promove elasticidade e resistência à extensão, enquanto as gliadinas geralmente conferem viscosidade e extensibilidade à massa (PUPPO; CALVELO; AÑÓN, 2005).

Os parâmetros extensográficos das farinhas controle e das adicionadas de CGTase parcialmente purificada estão apresentados na **Tabela 4.2**.

**Tabela 4.2.** Efeito da CGTase parcialmente purificada sobre as características extensográficas da farinha de trigo.

<i>Farinha</i>	<i>Resistência (U.E.)</i>	<i>Resistência máxima (U.E.)</i>	<i>Extensibilidade (min)</i>	<i>Número proporcional (R/E)</i>
Controle	520	700	135	3,8
15U CGTase*	> 1000	> 1000	100	> 10
30U CGTase*	1000	> 1000	100	10

\* (U/100g farinha de trigo).

\*\* Parâmetros extensográficos após 135 minutos de fermentação.

A farinha controle apresentou os parâmetros de resistência à extensão, extensibilidade e de número proporcional, específicos de farinha forte, ideal para a produção de pães, de acordo com a classificação apresentada por [Pizzinatto \(1997\)](#).

Todos os parâmetros extensográficos das massas adicionadas de CGTase foram alterados. A resistência a extensão (elasticidade) e a resistência máxima aumentaram fortemente em todas as massas adicionadas de CGTase, enquanto a extensibilidade reduziu em relação à massa controle (**Tabela 4.2**).

Os valores do número proporcional R/E encontrados para as massas adicionadas de CGTase foram superiores ao encontrado para a massa controle. Segundo [Pizzinatto \(1997\)](#), o valor do número proporcional relaciona a resistência à extensão e a extensibilidade da massa, e farinhas com R/E acima de 2,5 são consideradas fortes.

A adição da CGTase à farinha, tornou a massa capaz de suportar melhor a pressão exercida pelo gás carbônico produzido durante a etapa de fermentação. Este dado é interessante, pela natureza amilolítica da CGTase, que degrada o amido danificado em carboidratos de menor massa molecular. Isto facilitaria a ação da  $\beta$ -amilase endógena da farinha na produção de açúcares fermentáveis, acelerando o metabolismo das leveduras e consequentemente a produção de gás carbônico por esses microrganismos.

A farinha ideal para a produção de pão, apresenta um equilíbrio entre elasticidade e extensibilidade para suportar a pressão exercida pelo gás carbônico produzido durante a fermentação, e para que a massa sofra deformação adequada para a formação da estrutura do miolo dos pães. Os resultados deste trabalho mostram que a adição de CGTase aumentou a elasticidade e reduziu levemente a extensibilidade, causando um fortalecimento da farinha.

#### 4.3.1.3. Propriedades de pasta

As propriedades de pasta da farinha de trigo controle e das adicionadas de CGTase parcialmente purificada, foram determinadas por meio do RVA e estão apresentadas na **Tabela 4.3**.

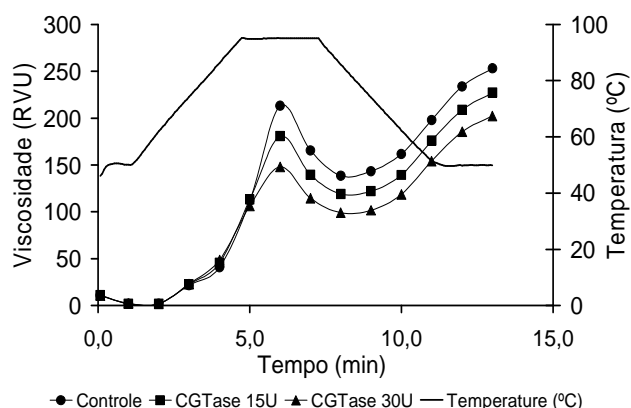
**Tabela 4.3.** Efeito da CGTase parcialmente purificada sobre as propriedades de pasta<sup>1</sup> da farinha de trigo.

Farinha	T. pasta (°C)	Pico viscosidade	Viscosidades (RVU)		
			Quebra	Viscosidade final	Setback
Controle	88,0 ± 0,1	214 ± 0,5	75,3 ± 0,8	253 ± 0,8	115 ± 1,1
15U CGTase*	87,1 ± 0,1	182 ± 6,4	63,5 ± 1,6	227 ± 4,9	109 ± 0,1
30U CGTase*	86,7 ± 0,6	151 ± 2,9	52,4 ± 0,2	202 ± 2,6	104 ± 0,1

<sup>1</sup>Média de duas replicatas.

\* CGTase (U/100g farinha de trigo).

A adição de CGTase parcialmente purificada reduziu o pico de viscosidade, a quebra, viscosidade final e tendência a retrogradação (*setback*), e a temperatura de pasta da farinha, de modo proporcional à concentração da enzima. (Tabela 4.3, Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Perfil viscoamilográfico da farinha de trigo adicionada de CGTase parcialmente purificada.

A redução da viscosidade de pico, viscosidade final e da tendência à retrogradação (*setback*) da farinha com adição de CGTase mostrou claramente a atuação da mesma sobre o amido da farinha. A CGTase sendo uma enzima amilolítica, quebra as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 do amido produzindo moléculas com menor massa molecular como as dextrinas e os oligossacarídeos, e assim, reduz a viscosidade de pico das farinhas. A retrogradação das moléculas de menor massa molecular é minimizada, deste modo justificando o menor valor de viscosidade final das farinhas adicionadas de CGTase.

A presença de  $\beta$ -ciclodextrina em pastas de amido de trigo reduziu a viscosidade de pico, viscosidade final e tendência á retrogradação deste amido (LIANG; KING; SHIH, 2002). Segundo esses pesquisadores as ciclodextrinas podem interferir fisicamente no processo de retrogradação das moléculas de amilose e amilopectina.

Resultados similares foram obtidos por Gujral e Rosell (2004), trabalhando com adição de CGTase em amido de trigo. Para esses pesquisadores a redução na tendência a retrogradação da amilose (*setback*) é resultado da atividade hidrolítica da enzima sobre o

amido e também da sua atividade ciclizante com a formação de complexos de ciclodextrina-lipídio. Esses complexos atuariam como um emulsificante reduzindo a retrogradação das moléculas de amilose.

A CGTase de *Bacillus clausii* E16 pode produzir ciclodextrinas, e esses oligossacarídeos podem estar envolvidos na desaceleração da retrogradação da amilose pela formação de complexos de inclusão.

#### 4.3.1.4. Propriedades térmicas

Os parâmetros de gelatinização e retrogradação da farinha de trigo controle e das adicionadas de CGTase parcialmente purificada estão apresentados nas **Tabelas 4.4 e 4.5**, respectivamente.

**Tabela 4.4.** Efeito da CGTase parcialmente purificada sobre as propriedades térmicas de gelatinização<sup>1</sup> da farinha de trigo<sup>a</sup>.

Farinha	$T_o^*(^{\circ}\text{C})$	$T_p^*(^{\circ}\text{C})$	$T_f^*(^{\circ}\text{C})$	$\Delta Hr^*(\text{J/g})$
Controle	$54,78 \pm 0,15^a$	$61,66 \pm 0,13^a$	$67,19 \pm 0,10^a$	$5,82 \pm 0,11^a$
15U CGTase**	$55,15 \pm 0,29^a$	$61,92 \pm 0,38^a$	$67,55 \pm 0,19^a$	$5,72 \pm 0,08^a$
30U CGTase**	$55,29 \pm 0,31^a$	$61,86 \pm 0,22^a$	$67,51 \pm 0,16^a$	$5,76 \pm 0,02^a$

\*  $T_o$ ,  $T_p$ ,  $T_f$  = temperatura inicial, de pico e final, respectivamente;  $\Delta H$ : variação de entalpia.

<sup>1</sup> Média de três replicatas.

<sup>a</sup> Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\*\* CGTase (U/100g farinha de trigo).

A presença de CGTase em qualquer concentração, não alterou as temperaturas de gelatinização ( $T_o$ ,  $T_p$ ,  $T_f$ ) e a entalpia de retrogradação ( $\Delta Hr$ ) da farinha (**Tabela 4.4**). A CGTase como qualquer enzima amilolítica, atua com mais eficiência no amido danificado e/ou gelatinizado. A faixa de temperatura usada neste experimento foi de 25°C a 125°C com uma taxa de aquecimento de 5°C por minuto. Provavelmente, o período de ação da CGTase no amido foi muito curto e as alterações causadas não puderam ser detectadas durante a gelatinização deste polímero.

Todas as amostras de farinhas gelatinizadas foram armazenadas por vários dias (3, 5, 7, e 10) à temperatura de 4°C, para o estudo da retrogradação do amido

O pico endotérmico não foi observado em nenhuma das amostras até o terceiro dia de armazenamento (**Tabela 4.5**). A partir do quinto dia houve um aumento do  $\Delta Hr$  para todas as amostras de farinha. Enquanto para a farinha controle houve um aumento progressivo do  $\Delta Hr$ , a partir do quinto dia, chegando a 0,98 J/g no décimo dia, para as farinhas adicionadas de CGTase, independente da concentração, o  $\Delta Hr$  observado no quinto dia não se alterou no

sétimo dia e aumentou no décimo, porém não atingindo metade do valor do  $\Delta H_r$  observado para a farinha controle no último dia de armazenamento (**Tabela 4.5**).

**Tabela 4.5.** Efeito da CGTase parcialmente purificada sobre a entalpia de retrogradação<sup>1</sup> da farinha<sup>a</sup> durante o armazenamento a 4°C.

Farinha	$\Delta H_r$ (J/g)			
	3 dias	5 dias	7 dias	10 dias
Controle	-	0,15 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,98 ± 0,09 <sup>a</sup>
15U CGTase*	-	0,14 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,40 ± 0,14 <sup>b</sup>
30U CGTase*	-	0,15 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,30 ± 0,02 <sup>b</sup>

$\Delta H_r$ : variação de entalpia

<sup>1</sup> Média de três replicatas

<sup>a</sup> Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

\* CGTase (U/100g farinha de trigo).

Esta análise verifica a retrogradação da molécula de amilopectina. A ausência de pico endotérmico até o terceiro dia é normal, já que a retrogradação da amilopectina é mais lenta que a da molécula de amilose. Pode-se observar o efeito da CGTase sobre a retrogradação da amilopectina. A redução da retrogradação provocada pela enzima, provavelmente se dá pela degradação das moléculas de amilopectina dificultando assim seu rearranjo em uma estrutura mais organizada.

### 4.3.2. Ação da CGTase nas caracterísitcas reológicas e térmicas da farinha de trigo

#### 4.3.2.1. Avaliação do volume e pH da massa

O volume das massas durante a fermentação e o pH das massas controle e das adicionadas de CGTase parcialmente purificadas estão apresentados na **Tabela 4.6**.

A adição de CGTase, nas concentrações de 15U e 30U, causou um aumento no volume das massas de 14% e 18%, respectivamente, quando comparado ao volume das massas controle.

Durante a etapa de fermentação das massas, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* realiza uma fermentação alcoólica, onde há a conversão anaeróbica de açúcares em dióxido de carbono e etanol. As amilases da farinha ( $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase) e a CGTase adicionada são hidrolases que desempenham uma função importante durante a etapa de fermentação. Essas enzimas agem nos grânulos de amido danificados liberando dextrinas, oligossacarídeos, maltose, glicose e no caso da CGTase também ciclodextrinas (CAUVAIN, 2007). Os

oligossacarídeos liberados pela ação da CGTase podem ser transformados em maltose pela ação da  $\beta$ -amilase endógena da farinha e esse dissacarídeo pode ser metabolizado pelas levedura. A CGTase possivelmente também libera indiretamente glicose no pão, auxiliando a produção de açúcares fermentáveis.

A oferta indireta de açúcares fermentáveis, pela ação da CGTase, possibilitaria uma produção e liberação mais pronunciada de dióxido de carbônio natural da fermentação, assim, aumentando a formação das células de gás na massa, provocando diretamente a formação da estrutura do miolo dos pães, e influenciando o volume dos mesmos.

**Tabela 4.6.** Efeito da CGTase parcialmente purificada sobre o volume e pH da massa.

<i>Massa</i>	<i>Volume (mL)</i>	<i>Aumento (%)</i>	<i>pH</i>
Controle	333		5,1
15U CGTase*	380	(+14%)	5,0
30U CGTase*	393	(+18%)	5,2

\*CGTase (U/100g farinha de trigo).

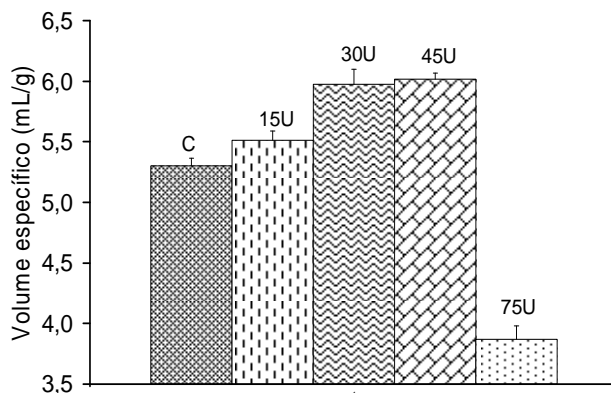
O pH das massas praticamente não se alterou com a adição de CGTase à farinha. O pH das massas adicionadas da maior concentração de CGTase foi o que mais se aproximou ao pH ótimo da enzima (6,0), e também foram as massas que apresentaram o melhor crescimento durante a fermentação (**Tabela 4.6**).

Todas as enzimas têm um pH ótimo ou uma faixa de pH no qual sua atividade é máxima (TIPTON, 1992). Uma mudança no estado de ionização dos grupos laterais dos aminoácidos do sítio ativo altera a atividade catalítica da enzima. A ionização também pode ocorrer em um aminoácido crítico, eliminando uma interação iônica essencial para a estabilidade da enzima. Deste modo, o pH do produto, no caso deste trabalho, o pão, tem que ser semelhante ao pH ótimo da enzima, para que esta possa apresentar uma atividade catalítica ótima ou próxima da ótima, como observado.

#### 4.3.2.2. Avaliação do volume do pão

O volume específico dos pães controle e dos adicionados de CGTase parcialmente purificada está apresentado na **Figura 4.2**.

A adição de CGTase nas concentrações de 15U, 30U, 45U/100 g de farinha, aumentou os volumes específicos dos pães em 3,8%, 13,2%, 13,2% em relação aos pães controle, respectivamente (**Figura 4.2**). No entanto, a adição de CGTase na concentração de 75U, provocou uma redução de 26% no volume específico dos pães em relação aos pães controle.



**Figura 4.2.** Efeito da (CGTase) parcialmente purificada sobre o volume específico do pão. CGTase (U/100g farinha de trigo).

Resultados similares aos nossos foram encontrados por [Jemli et al. \(2007\)](#), que adicionaram CGTase da bactéria *Paenibacillus pabuli* US132 e obtiveram um aumento de 11% no volume dos pães, enquanto [Shim et al. \(2007\)](#), adicionaram *Saccharomyces cerevisiae* modificado geneticamente com a inclusão do gene responsável pela síntese da CGTase, e observaram um aumento de 20% no volume específico desses pães.

Para [Shim et al. \(2007\)](#), os efeitos positivos no volume específico dos pães são atribuídos à produção de maltooligossacarídeos e também a produção de açúcares fermentáveis como a glicose e a maltose pela ação da CGTase, que podem ser usados no metabolismo fermentativo da levedura, produzindo CO<sub>2</sub>, e assim promovendo o aumento no volume. Por outro lado, [Jemli et al. \(2007\)](#), defendem que o aumento do volume dos pães não está exclusivamente relacionado a produção de açúcares fermentáveis, mas também depende das interações das ciclodextrinas com a matrix protéica da massa.

[Gujral et al. \(2003\)](#), trabalharam com CGTase adicionadas em pães de arroz, e observaram um aumento no volume dos pães de 70% em relação aos pães controle. Para estes pesquisadores o efeito positivo da CGTase é devido a atividade amilolítica desta enzima, mais também devido à sua atividade ciclizante, que produz ciclodextrina capazes de formar complexos de inclusão com lipídios e também proteínas.

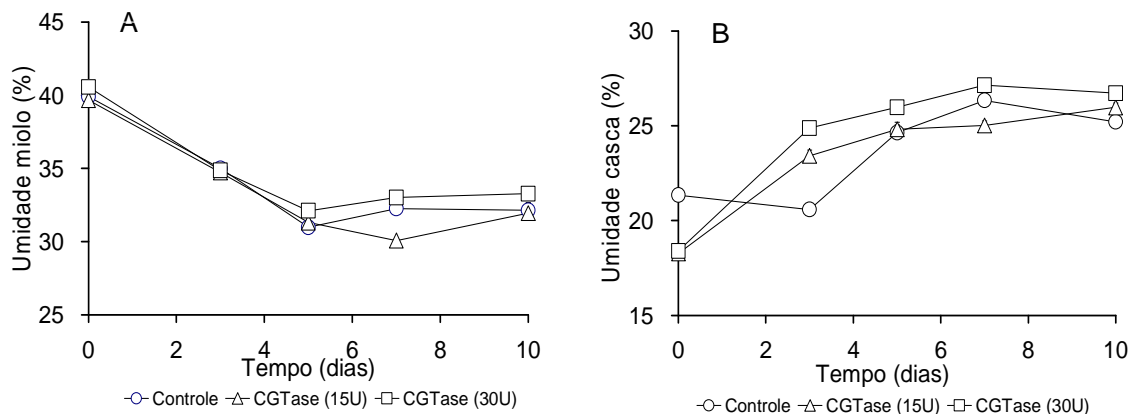
### 4.3.3. Ação da CGTase no envelhecimento do pão

#### 4.3.3.1. Conteúdo de água do miolo e da crosta do pão

O conteúdo de água do miolo e da crosta dos pães controle e dos adicionados de CGTase parcialmente purificada está apresentada na **Figura 4.3**.

Durante o armazenamento, entre o primeiro e o quinto dia, houve uma redução no conteúdo de água do miolo dos pães controle e dos adicionados de CGTase (**Figura 4.3 A**),

enquanto ocorreu um aumento no conteúdo de água da crosta (**Figura 4.3 B**), indicando uma migração da água do miolo para a crosta. A partir do quinto dia de armazenamento, o conteúdo de água do miolo e da crosta, de todas as amostras, tendeu a estabilização.



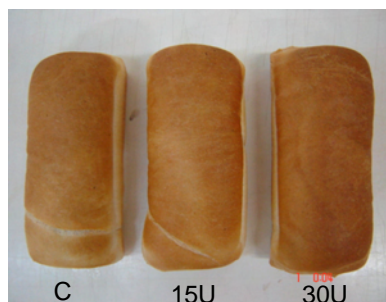
**Figura 4.3.** Efeito da CGTase parcialmente purificada sobre o conteúdo de água do miolo (A) e da crosta (B) durante o armazenamento do pão a 4 °C. CGTase (U/100 g farinha de trigo).

Ao final de dez dias de armazenamento o miolo dos pães adicionados de CGTase na concentração de 30U apresentava um conteúdo de água 4% superior ao controle e um conteúdo de água da crosta 6% superior aos pães controle. Portanto, apesar da clara migração de água do miolo para a crosta, os carboidratos higroscópicos possivelmente formados pela ação da CGTase no pão permitiram a obtenção de pães mais úmidos (**Figura 4.3 A,B**).

Segundo [Lee et al. \(2002\)](#), que analisaram a produção de maltooligossacarídeos em pães com CGTase, observaram que a composição e a quantidade de maltooligossacarídeos nos pães variaram dependendo do tipo de enzima usada (selvagem ou mutante). Nos pães analisados por esses pesquisadores, os principais produtos encontrados foram maltotriose, maltotetose e maltopentose, todos os açúcares higroscópicos.

O maior conteúdo de água observado nos pães adicionados da maior concentração de CGTase, indica que a enzima degrada o amido da farinha de trigo em dextrinas e oligossacarídeos, que são carboidratos mais higroscópicos do que o amido.

O escurecimento (visual) gradativo da crosta dos pães adicionados de CGTase também confirma a atividade amilolítica da enzima (**Figura 4.4**). Altas temperaturas da crosta alcançadas durante o forneamento causam diferentes reações que não ocorrem no miolo, como a reação de Maillard. Essa reação requer açúcares redutores que também podem estar sendo fornecidos pela CGTase, o que justificaria o escurecimento mais pronunciado dos pães adicionados desta enzima.

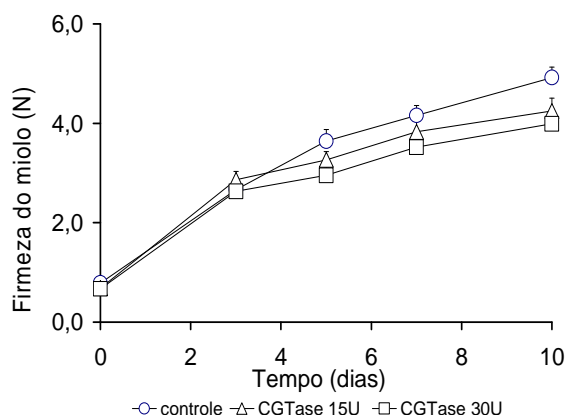


**Figura 4.4.** Efeito da CGTase parcialmente purificada sobre a coloração da crosta do pão. CGTase (U/100 g de farinha de trigo). Da esquerda para direita: controle, 15U e 30U de CGTase.

#### 4.3.3.2. Avaliação da firmeza do miolo do pão

A firmeza do miolo dos pães controle e dos adicionados de CGTase parcialmente purificada está apresentada na **Figura 4.5**.

Nos três primeiros dias de armazenamento praticamente não houve diferença entre a firmeza do miolo dos pães obtidos da farinha controle e daquelas adicionadas de CGTase. Após este período, houve uma redução na firmeza do miolo dos pães adicionados da enzima, e ao final do décimo dia foi observada uma redução de 13,6% e 20% em relação ao controle, para as concentrações de 15U e 30U da enzima, respectivamente.



**Figura 4.5.** Efeito da CGTase parcialmente purificada sobre a firmeza do miolo durante o armazenamento do pão a 4 °C. CGTase (U/100 g farinha de trigo).

Experimento semelhante usando CGTase isolada de *Paenibacillus pabuli* US132, e *Saccharomyces cerevisiae* modificado geneticamente com a inclusão do gene responsável pela síntese da CGTase, mostrou uma redução na firmeza do miolo dos pães de 42% e 54%, respectivamente (JEMLI et al., 2007; SHIM et al., 2007). Para esses pesquisadores o efeito da CGTase pode ser atribuído a degradação do amido pela CGTase minimizando a retrogradação da amilopectina durante o armazenamento. As CDs poderiam causar um impedimento estérico por ser um ciclooligossacarídeo e também diminuir a perda de água pelo sistema devido aos grupos hidroxilas (OH) da face externa das CDs e devido também à presença de outros maltooligosacarídeos que venha ser produzidos pela ação desta enzima. Outros pesquisadores

trabalhando com CGTase comercial nas concentrações de 0,066 e 0,122 U/100 g de farinha de arroz, observaram uma redução na firmeza do miolo de 38,8% e 51,2%, respectivamente, no quinto dia de armazenamento a temperatura ambiente (25°C) (GUJRAL; HAROS; ROSSEL, 2003).

GUJRAL et al., 2003 mostraram que a adição de CGTase reduziu a firmeza em 53% nestes pães em relação aos pães controle. Esses pesquisadores acreditam que essa redução foi devido à ação hidrolítica da enzima, que desaceleraria a retrogradação da amilopectina, mais também pela produção de ciclodextrinas, que poderiam formar complexos de inclusão com lipídeos e também com proteínas, retardando assim a retrogradação da amilose pela redução da tensão superficial da massa e pela redução das interações amido(amilose)-glúten. Outros estudiosos também defendem que uma das causas da firmeza do miolo durante o armazenamento seja devido as interações entre a amilose e amilopectina com o glúten (HE; HOSENEY, 1990; MARTIN; ZELEZNAK; HOSENEY, 1991; MARTIN; HOSENEY, 1991).

Segundo Cauvain, (2007), os aditivos antienvhecimento proporcionam maciez aos pães por afetarem a tensão superficial da massa, minimizando a reorganização das cadeias amorfas de amido em formas mais cristalinas. Por outro lado, a dureza do pão também pode ser causada pela perda ou redistribuição da água (migração de água). A produção de glicose, maltose, oligossacarídeos e ciclodextrinas pela ação da CGTase, poderia influenciar a retenção de água nestes pães, por serem carboidratos mais higroscópicos que o amido.

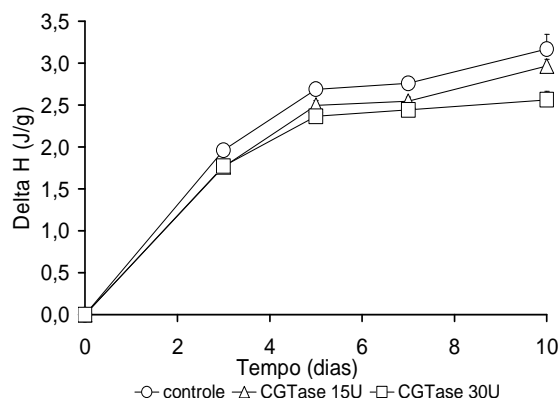
#### 4.3.3.3. Retrogradação da amilopectina do miolo do pão

As entalpias de retrogradação ( $\Delta H_r$ ) da amilopectina do miolo dos pães controle e dos adicionados de CGTase parcialmente purificada estão apresentadas na **Figura 4.6**.

Em todas as amostras nenhuma endoterma no tempo zero foi encontrada. No pão, a retrogradação da amilose ocorre nas primeiras horas após o forneamento. A retrogradação da amilopectina ocorre a longo prazo e é considerada um dos principais fenômenos responsáveis pela firmeza do miolo durante o armazenamento. (RIBOTTA; BAIL, 2007). Outros fatores, como temperatura de armazenamento, estrutura do polímero e outros componentes presentes na farinha também influenciam o comportamento de retrogradação da amilopectina (ELIASSON, 1986).

Nos três primeiros dias de armazenamento a variação na entalpia de retrogradação ( $\Delta H_r$ ) foi linear e semelhante para todas as amostras estudadas. A adição de CGTase provocou uma redução na entalpia de retrogradação ( $\Delta H_r$ ), a partir do terceiro dia e foi mais pronunciada para a maior concentração da enzima. Ao final do décimo dia, os pães adicionados com 15U e 30U de enzima apresentaram uma redução do  $\Delta H$  de 14% e 17%,

respectivamente em relação aos pães controle. Estes resultados estão correlacionados (0,98) com os obtidos nas análises de firmeza.



**Figura 4.6.** Efeito da CGTase parcialmente purificada sobre a entalpia de retrogradação do miolo do pão durante o armazenamento a 4°C. Xilanase (U/100g farinha de trigo).

Lee et al. (2002) adicionando CGTase selvagem e mutante de *Bacillus subtilis* LK88, Gujral; Haros; Rosell, (2003), adicionando CGTase comercial e Shim et al. (2007), trabalhando com *Saccharomyces cerevisiae* modificado geneticamente com a inclusão do gene responsável pela síntese da CGTase, também observaram ao final do período de armazenamento uma efetiva redução na entalpia de retrogradação ( $\Delta H_r$ ) do miolo desses pães em relação aos pães controle.

Segundo Lee et al. (2002) os maltooligossacarídeos, que são moléculas higroscópicas produzidas pela ação da CGTase no amido, seriam responsáveis por interferir nas interações amido-amido, pela manutenção da água no sistema. Esses pesquisadores não atribuíram a menor retrogradação da amilopectina à formação de ciclodextrina, pois em todos os pães foi observada uma redução na retrogradação deste polímero, independente da presença ou não de CDs. Shim et al. (2007), também observaram uma diminuição na retrogradação da amilopectina, mesmo não tendo encontrado ciclodextrinas nos pães adicionados de CGTase.

A conhecida natureza amilolítica da CGTase, e a redução da amilopectina encontrada neste trabalho, mostrou a influência da massa molecular da amilopectina no processo de retrogradação da mesma.

#### **4.3.4. Estudo da suscetibilidade enzimática do amido de trigo, frente à ação da CGTase**

##### **4.3.4.1. Análise dos produtos de reação da CGTase sobre o amido isolado da farinha de trigo por HPAEC-PAD**

Os produtos obtidos da hidrólise do amido isolado da farinha de trigo pela CGTase parcialmente purificada foram identificados e quantificados por HPAEC-PAD (Cromatografia de Troca Aniônica de Alta Eficiência com Pulso Amperométrico) e por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) é a única enzima capaz de converter amido em oligossacarídeos cíclicos denominados de ciclodextrinas por meio de uma reação de ciclização (JEMLI et al., 2007). Todas as CGTases produzem uma mistura de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrinas e a produção das diferentes ciclodextrinas e suas proporções, dependem das condições de reação e principalmente da fonte microbiana da enzima (BLACKOOD; BUCKE, 2000; DOUKYU; BIWER; ANTRANIKIAN; HEINZLE, 2003).

Na presença de amido de trigo, a CGTase usada neste trabalho produziu apenas dois tipos de ciclodextrinas a  $\beta$ -CD e a  $\gamma$ -CD, como observado na **Tabela 4.7**. A concentração de  $\beta$ -CD foi bem superior à de  $\gamma$ -CD em todos os tempos de hidrólise analisados, indicando a especificidade desta enzima para a formação de  $\beta$ -CD. A taxa de conversão máxima do amido em ciclodextrinas foi de 28,1% em 24 horas de hidrólise, e após esse tempo observou-se um estado estacionário na reação de ciclização catalisada por esta enzima. Uma conversão máxima de amido em CDs de 42% foi obtida por Jemli et al., 2007) a partir de 100U/g amido de batata, pela CGTase de *Paenibacillus pabuli* US 132, após 42 horas de hidrólise. Esses pesquisadores observaram que concentrações de enzima superiores à citada (100U/g amido) não aumentaram a produção de ciclodextrina.

Alves-Prado et al., (2008) usando amido de mandioca e batata-doce (2,5%) como substrato para a ação da CGTase isolada do mesmo microrganismo estudado neste trabalho, também observaram a formação apenas das CDs  $\beta$  e  $\gamma$ , sendo a concentração da primeira superior à da segunda, como também observado neste trabalho. Entretanto, quando esses pesquisadores utilizaram amidos de milho normal e ceroso como substratos, apenas a formação de  $\beta$ -ciclodextrina foi observada.

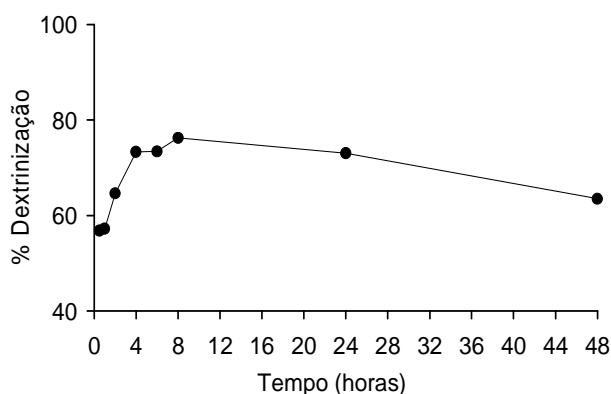
A fonte amilácea interfere na atividade da enzima. Geralmente, o amido contém cerca de 20% a 30% de amilose e 70% a 80% de amilopectina. Essa porcentagem e as características estruturais desses polissacarídeos variam dependendo de sua fonte botânica (Franco et al., 2001). Trabalho recente realizado no Laboratório de Cereais, Raízes e Tubérculos com vários cultivares de trigo apontou um conteúdo de amilose aparente de cerca de 28% para o amido de trigo (YONEMOTO; CALORI-DOMINGUES; FRANCO, 2007).

**Tabela 4.7.** Produtos obtidos da degradação do amido de trigo gelatinizado (2,5% p/v) pela ação da CGTase parcialmente purificada, detectados por HPLC.

<i>Tempo de hidrólise (h)</i>	<i><math>\beta</math>-CD (mg/mL)</i>	<i><math>\gamma</math>-CD (mg/mL)</i>	<i>Total</i>	<i>Conversão CD* (%)</i>
0,5	0,99	0,32	1,31	5,24
1	3,23	0,67	3,90	15,6
2	3,65	0,73	4,38	17,5
4	4,14	0,69	4,83	19,3
6	5,55	1,03	6,58	26,3
8	5,93	1,08	6,96	27,8
24	5,72	1,31	7,03	28,1
48	5,65	1,10	6,75	27,0

\*Taxa de conversão do amido em ciclodextrina (CD).

A dextrinização máxima do amido de trigo foi de 76% após 8 horas de hidrólise, e neste mesmo período, as proporções de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD encontradas foram de 0:86:14, respectivamente. **(Figura 4.7).** Assim, a CGTase estudada mostrou ser específica para a formação de  $\beta$ -CD podendo ser classificada como uma  $\beta$ -CGTase. [Alves-Prado et al., \(2008\)](#) observaram uma porcentagem de dextrinização do amido de mandioca e batata-doce de 95% e 42%, respectivamente após 4 horas de hidrólise. Entre as três ciclodextrinas, a  $\beta$ -CD é a de maior interesse, devido ao tamanho de sua cavidade hidrofóbica, a qual é adequada para acomodar diferentes moléculas como compostos voláteis, proteínas e lipídios ([SZEJTLI, 1992](#); [DOUKYU; KUWAHARA; AONO, 2003](#)).



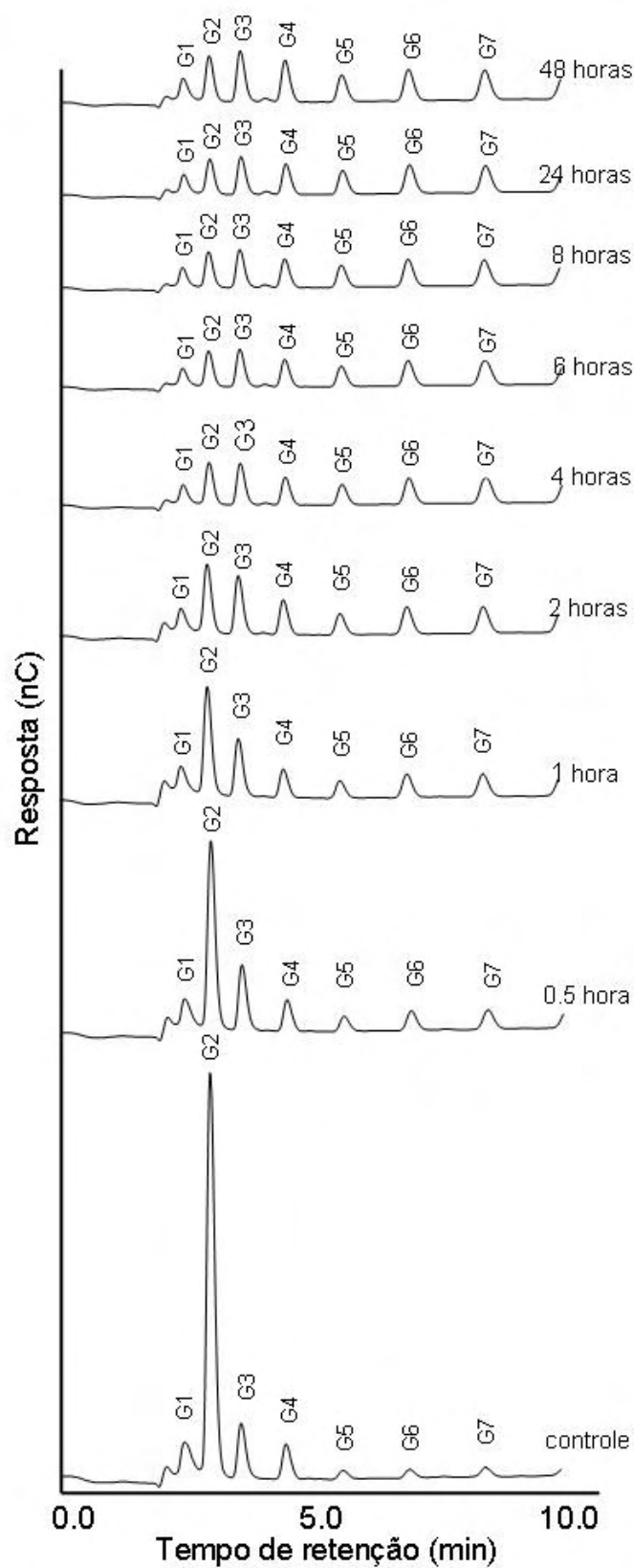
**Figura 4.7.** Produção de CDs pela ação da enzima CGTase parcialmente purificada sobre o amido de trigo gelatinizado. Porcentagem de dextrinização (método-iodo).

As CGTases também catalisam outras reações: a reação de acoplamento que é reversa a ciclização, em que as ciclodextrinas são clivadas e transferidas a um receptor linear (dextrinas lineares), e a reação de desproporcionamento em que dois oligossacarídeos lineares

são convertidos em outros dois oligossacarídeos também lineares, mas de tamanhos diferentes (Van Der Veen, 2000). Em adição, estas enzimas também possuem uma fraca atividade hidrolítica, em que o amido é hidrolisado a dextrinas lineares e a água é o aceptor glicosil (BLACKWOOD; BUCKE, 2000; JEMLI et al., 2007).

A **Figura 4.8** mostra os picos dos produtos identificados após catálise enzimática do amido de trigo pela CGTase (30U/100 g de farinha) por 48 horas, e os resultados estão sumarizados na **Tabela 4.8**.

Foram identificados o monossacarídeo glicose ( $G_1$ ), o dissacarídeo maltose ( $G_2$ ) e os oligossacarídeos com DP de 3 a 7 ( $G_3$ - $G_7$ ). No tempo zero (controle) pode-se verificar a presença de glicose, maltose e oligossacarídeos com DPs 3-7. Esses produtos provavelmente foram formados pela ação das enzimas endógenas da farinha, a  $\alpha$ -amilase e a  $\beta$ -amilase. Normalmente, há uma variação da quantidade de  $\alpha$ -amilase presente no trigo e consequentemente na farinha em função das condições do plantio, enquanto que a quantidade de  $\beta$ -amilase, praticamente não se altera (POUTANEN, 1997). Com o tempo de hidrólise a concentração de maltose reduziu e as concentrações dos oligossacarídeos  $G_4$ - $G_7$  aumentaram, indicando que a CGTase realizou as reações de acoplamento, desproporcionamento e/ou teve uma atividade hidrolítica (**Tabela 4.8**).



**Figura 4.8.** Perfil cromatográfico obtido por HPAEC-PAD da degradação do amido de trigo incubado com CGTase (30U) parcialmente purificada a 55°C em diferentes tempos. G<sub>1</sub>: glicose; G<sub>2</sub>: maltose, G<sub>3</sub>: maltotriose, G<sub>4</sub>: maltotetraose, G<sub>5</sub>: maltopentose, G<sub>6</sub> maltohexose, G<sub>7</sub>; maltoseptose. Coluna analítica PA-100.

**Tabela 4.8.** Produtos obtidos da degradação do amido de trigo, pela CGTase (30U) parcialmente purificada a 55°C durante 48h, detectados por HPAEC-PAD.

<i>Tempo de hidrólise (h)</i>	<i>G<sub>1</sub> (µg/mL)</i>	<i>G<sub>2</sub> (µg/mL)</i>	<i>G<sub>3</sub> (µg/mL)</i>	<i>G<sub>4</sub> (µg/mL)</i>	<i>G<sub>5</sub> (µg/mL)</i>	<i>G<sub>6</sub> (µg/mL)</i>	<i>G<sub>7</sub> (µg/mL)</i>
Controle	2,67	56,46	8,98	5,93	2,03	1,87	3,42
0,5	2,58	29,71	11,82	6,53	4,03	2,12	7,66
1	1,17	18,35	11,50	6,57	5,17	5,14	10,28
2	2,26	13,68	13,76	9,35	7,26	7,04	13,73
4	2,14	9,23	10,86	8,30	7,91	9,52	14,57
6	5,65	12,60	13,65	11,14	8,83	10,22	15,76
8	5,67	12,07	13,41	11,37	9,28	11,08	16,45
24	2,28	7,93	9,49	9,56	10,06	11,52	17,27
48	2,64	9,86	12,93	12,02	10,09	12,03	17,10

#### 4.3.5. Ação da CGTase durante o processo de panificação

##### 4.3.5.1. Análise de maltooligossacarídeos e ciclodextrinas formados no pão pela ação da CGTase

Os produtos obtidos da adição de CGTase nos pães foram identificados e quantificados por HPAEC-PAD (Cromatografia de Troca Aniônica de Alta Eficiência com Pulso Amperométrico) e por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

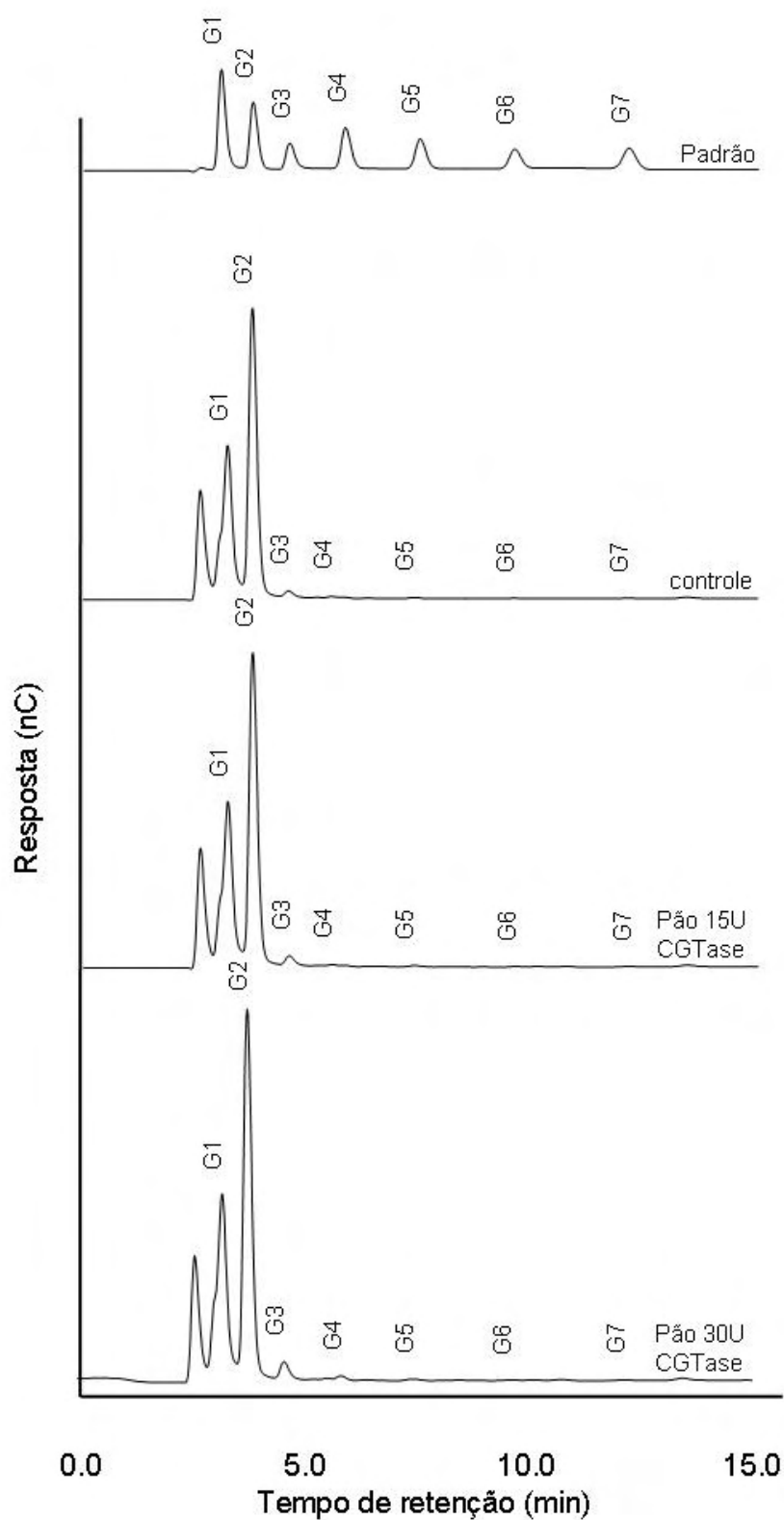
Depois de confirmada a formação de  $\beta$  e  $\gamma$ -CDs pela CGTase pela hidrólise do amido de trigo isolado da farinha, foram realizadas as mesmas análises cromatográficas para verificar a capacidade de formação desses oligossacarídeos cíclicos durante o processo de panificação.

A concentração de  $\beta$ -CD nos pães adicionados de 30U de CGTase por 100 g de farinha foi de 0,03 mg/10 g de miolo, uma concentração 30 vezes menor que a encontrada quando a CGTase teve como substrato o amido isolado. As ciclodextrinas alfa e gama não foram detectadas nesses pães. Apesar da menor concentração de  $\beta$ -CD encontrada nos pães, não descartamos a possibilidade desse carboidrato influenciar positivamente as características tecnológicas e o processo de envelhecimento. Nos pães adicionados de 15U CGTase/100 g de farinha não foram detectadas ciclodextrinas, porém acreditamos que elas tenham sido produzidas pela ação da CGTase, mas não detectadas pelo índice de refração, devido sua baixa sensibilidade. Como era esperado as CDs não foram detectadas nos pães controle, já que a CGTase não é uma enzima endógena do trigo.

Trabalhos realizados por [Gujral et al., 2003](#) e [Gujral; Haros; Rosell, 2003](#) analisando a produção de ciclodextrinas por HPLC em pães de arroz adicionados de CGTase, mostraram quantidades de CDs superiores às encontradas neste trabalho. As  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD foram detectadas, sendo a  $\alpha$ -CD a produzida em maior extensão, seguida da  $\beta$ -CD e da  $\gamma$ -CD. A formação de CDs acompanhada pela reação de fenolftaleína em pães adicionados de CGTase (selvagem e mutante) de *Bacillus subtilis* LKS88, também foi superior a encontrada neste trabalho, como relatado por [Lee et al, \(2002\)](#). Por outro lado, outros trabalhos sobre panificação com adição de CGTase livre e de *Saccharomyces cerevisiae* mutante para o gene que expressa a enzima CGTase, não detectaram a presença de CDs nesses pães ([SHIM et al. 2004](#); [SHIM et al., 2007](#)).

Em alguns trabalhos, a presença de ciclodextrinas confirma a atividade de ciclicização da CGTase durante o processo de panificação, enquanto em outros elas não são detectadas. Isto pode ocorrer porque em cada caso as CGTases estudadas são isoladas de microrganismos diferentes, e a complementaridade entre enzima e substrato é fundamental em enzimologia.

A **Figura 4.9** mostra os picos dos produtos identificados por HPAEC-PAD nos pães controle e adicionados de CGTase, e os resultados estão sumarizados na **Tabela 4.9**. O aumento de G1 a G5 nos pães adicionados de 15U de CGTase e o aumento de G1 a G5 e G7 nos pães adicionados de 30U de CGTase, indica a atividade amilolítica dessa enzima durante o processo de panificação (**Tabela 4.9**). Os carboidratos G1 a G7 encontrados nos pães controle são devido à atividade amilolítica das enzimas endógenas  $\alpha$  e  $\beta$ -amilase. A não visualização dos picos G5 a G7 na **Figura 4.9** é devido à diferença na concentração desses produtos com relação à glicose e maltose, mas quando plotados em menor escala fica claro a presença desses oligossacarídeos, até porque eles foram reconhecidos a partir de seus respectivos padrões cromatográficos.



**Figura 4.9.** Perfil cromatográfico obtido por HPAEC-PAD dos maltooligossacarídeos presentes nos pães controles e adicionados de GTase parcialmente purificadas (15U e 30U/100 g de farinha) de *Bacillus clausii* E16. G<sub>1</sub>: glicose; G<sub>2</sub>: maltose, G<sub>3</sub> maltotriose, G<sub>4</sub>: maltotetraose, G<sub>5</sub>: maltopentose. Coluna analítica PA-100

**Tabela 4.9** Produtos produzidos no miolo dos pães durante o processo de panificação, pela ação da CGTase, detectados por HPAEC-PAD.

Produtos da hidrólise	Pão controle	Pão 15U CGTase	Pão 30U CGTase
G <sub>1</sub> (mg/mL)	10,28	11,30 (+10%)	12,98 (+26%)
G <sub>2</sub> (mg/mL)	8,52	9,16 (+8%)	10,91 (+28%)
G <sub>3</sub> (mg/mL)	0,21	0,33 (+57%)	0,62 (+195%)
G <sub>4</sub> (mg/mL)	0,034	0,036 (+6%)	0,16 (+371%)
G <sub>5</sub> (mg/mL)	0,082	0,088 (+7%)	0,12 (+46%)
G <sub>6</sub> (mg/mL)	0,033	0,022 (-33%)	0,029 (-12%)
G <sub>7</sub> (mg/mL)	0,060	0,039(-35%)	0,066 (+10%)

\* CGTase (U/100g farinha de trigo).

Lee et al. (2002) realizaram experimentos semelhantes utilizando CGTase (selvagem e mutante) isolada de *Bacillus subtilis* LKS88. Esses pesquisadores conseguiram detectar por HPAEC-PAD glicose e oligossacarídeos com DP's 2-5 nos pães. Para esses pesquisadores a higroscopicidade dos oligossacarídeos produzidos pela CGTase pode interferir nas interações amido-amido por manter água ao redor das moléculas de amilose e amilopectina, diminuindo a taxa de retrogradação do pão durante o armazenamento.

Com as análises cromatográficas realizadas nos pães adicionados de CGTase, foi possível confirmar a atividade enzimática de degradação (reação de acoplamento, desproporcionação e/ou atividade hidrolítica) e de ciclização do amido pela CGTase, mesmo durante o processo de panificação. As alterações positivas causadas pela CGTase como aumento da estabilidade e da elasticidade das massas, aumento do volume das massas e dos pães e principalmente a redução da firmeza do miolo e retardo na retrogradação da amilopectina podem ser atribuídas a atividade degradativa da CGTase sobre o amido.

#### 4.4. Conclusão

A aplicação de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) parcialmente purificada de *Bacillus clausii* E16 produziu alterações nas propriedades das massas como o aumento da estabilidade e elasticidade, enquanto promoveu leve redução da extensibilidade. Esta enzima aumentou o volume das massas e dos pães e reduziu à retrogradação da amilopectina e a firmeza do miolo, podendo ser usada como uma enzima antienvhecimento. Nas análises de suscetibilidade da CGTase frente ao amido observou-se claramente a realização de reações de acoplamento, desproporcionação e/ou uma atividade hidrolítica. A presença principalmente de  $\beta$ -ciclodextrina confirma que a CGTase estudada neste trabalho é uma  $\beta$ -CGTase. A presença

de ciclodextrina no pão mostrou a preservação da atividade de ciclização da CGTase durante o processo de panificação, apesar destas CDs terem sido detectadas em concentrações muito baixas.

Apesar da higroscopicidade dos produtos liberados pela ação da CGTase, provavelmente o efeito antienvhecimento não possa ser atribuído apenas a este fato, pois não houve alteração na absorção de água pela massa e os pães adicionados com 30U de CGTase apresentaram apenas um discreto aumento do conteúdo de água do miolo e da crosta ao final de dez dias de armazenamento.

O mecanismo de ação da CGTase está relacionado a produção de glicose, maltose e maltooligosacarídeos pela degradação das moléculas de amilose e amilopectina. A redução da retrogradação das moléculas de amilopectina possivelmente se deu pela maior dificuldade de reorganização das moléculas de baixa massa molecular. A produção de ciclodextrina também influenciou positivamente, possivelmente pela formação de complexos com lipídios adicionados a massa e com moléculas de baixa massa molecular, proporcionando uma maior maciez aos pães adicionados da enzima, atuando como um emulsificante.

#### 4.5. Referências

- ALVES-PRADO, H. F.; HILÁRIO, E; GOMES, E; DA SILVA, R. Optimization of cyclodextrin glucanotransferase production from *Bacillus clausii* E16 in submerged fermentation using response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.137, p. 189-196, 2007.
- ALVES-PRADO, H. F., et al. Production of cyclodextrins by CGTase from *Bacillus clausii* using different starches as substrates. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, v. 146, p. 3-13, 2008.
- BLACKWOOD, A. D; BUCKE, C. Addition of polar organic solvents can improve the product selectivity of cyclodextrin glycosyltransferase solvent effects on CGTase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, p. 704-708, 2000.
- BOYLE, P. J.; HEBEDA, R. E. Antistaling enzymes for baked goods. *Food Technology*, v. 44, p. 129, 1990.
- CAUVAIN, S. P. **Bread making: improving quality**. Washington: Woodhead Publishing Limited, 2007.
- DOUKYU, N; KUWAHARA, H; AONO, R. Isolation of *Paenibacillus illinoisensis* that produces cyclodextrin glucanotransferase resistant to organic solvents. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 67, p. 334-340, 2003.
- ELIASSON, A. C. Retrogradation of starch as measured by differential scanning calorimetry. In: HILL, R. D; MUNCK, L. **New Approaches to Research on Cereal Carbohydrates**. Amsterdam: Elsevier, p. 93-98. 1986.
- FRANCO, C. M. L. et al. **Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas, propriedades gerais do amido**. Campinas: Fundação Cargill, v.1, 2001.
- FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amilose as the substrate. **Journal of Biochemistry**, v. 41, p. 583-603, 1954.
- GOESAERT, H; BRIJS, K; VERAVERBEKE, W. S; COURTIN, C. M; GEBRUERS, K; DELCOUR, J. A. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. **Food Science & Technology**, v.16, p.12-30, 2005.

Guarda, A., Rosell, C.M., Benedito, C., Galotto, M.J. Different hydrocolloids as bread improvers and antistaling agents. **Food Hydrocolloids**, v.18, p.241-247, 2004.

GUJRAL, H. S; GUARDIOLA, I; CARBONELL, J. V; ROSELL, C. M. Effect of Cyclodextrinase on Dough Rheology and Bread Quality from Rice Flour. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3814-3818, 2003.

GUJRAL, H. S; HAROS, M; ROSELL, C. M. Starch hydrolyzing enzymes for retarding the of rice bread. **Cereal Chemistry**, v. 80, p. 750-754, 2003.

GUJRAL, H. S; ROSELL, C. M. Modification of pasting properties of wheat starch by cyclodextrin glycosyltransferase. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 1685-1690, 2004.

HE. H, HOSENEY, R. C. Changes in bread firmness and moisture during long-term storage. **Cereal Chemistry**, v. 67, p. 603-605, 1990.

HOSENEY, R. C. Fuctional properties of pentosans in baked foods. **Food Technology**, v. 38, p. 114-117, 1984.

JEMLI, S; MESSAOUD, E. B; AYADI-ZOUARI, D; NAILI, B; KHEMAKHEM, B; BEJAR, S. A  $\beta$ -cyclodextrin glycosyltransferase from a newly isolated *Paenibacillus pabuli* US132 strain: Purification, properties and potential use in bread-making. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 44-50, 2007.

KOIZUMI, K; FUKUDA, M; HIZUKURI, S. Estimation of the distributions of chain length of amylopectins by high-performance liquid chromatography with pulsed amperométrico detection. **Journal of Chromatography**, v. 585, p. 233-239, 1991.

LEE, S. H; KIM, Y. W; LEE, S; AUH, J. H; YOO, S. S; KIM, T. J; KIM, J. W; KIM, S. T; RHO, H. J; CHOI, J. H; KIM, Y. B; PARK, K. H. Modulation of Cyclizing Activity and Thermostability of Cyclodextrin Glucanotransferase and Its Application as an Antistaling Enzyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1411-1415, 2002.

LIANG, X; KING, J. M; SHIH, F. F. Pasting property differences of commercial and isolated rice starch with added lipids and  $\beta$ -cyclodextrin. **Cereal Chemistry**, v. 79, p. 812-818, 2002.

MÄKELA, M.J; KORPELA, T.K; PUISTO, J; LAAKSO, S.V. Nonchromatographic cyclodextrin: evaluation of sensitivity, and conversion mixture applications. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.36, p.83-88, 1988.

MARTIN, M. L.; ZELEZNAK, K. J; HOSENEY, R. C. A mechanism of bread firming. I. Role of starch swelling. **Cereal Chemistry**, v. 68, p. 503-507, 1991.

MARTIN, M. L.; HOSENEY, R. C. A mechanism of bread firming. II. Role of starch hydrolyzing enzymes. **Cereal Chemistry**, v. 68, p. 498-503, 1991.

PIZZINATTO, A. Qualidade da farinha de trigo: conceito, fatores determinantes e parâmetros de avaliação e controle. **Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos**, 1997.

PONGSAWASDI, P; YAGISAWA, M. Screening and indentification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing bacteria. **Journal Fermentation Tecnology**, v. 65, p. 463-467, 1987.

POUTANEN, K. An important tool in the improvement of the quality of cereal foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, p.300-306, 1997.

PUPPO, M. C; CALVELO, A; AÑÓN, M. C. Physicochemical and rheological characterization of wheat flour dough. **Cereal Chemistry**, v. 82, p. 173-181, 2005.

RIBOTTA, P. D; BAIL, A. LE. Thermo-physical assessment of bread during staling. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie-Food Science and Technology**, v. 40, p. 879-884, 2007.

STAMPFLI, L., NERSTEN, B. Emulsifiers in bread making. **Food Chemistry**, v. 52, p. 353-360, 1995.

SHIM, J. H; SEO, N. S; ROH, S. A; KIM, J. H; CHA, H; PARK, K. H. Improved Bread-Baking Process Using *Saccharomyces cerevisiae* Displayed with Engineered Cyclodextrin Glucanotransferase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4735-4740, 2007.

SZEJTLI, J. The cyclodextrins and their applications in biotechnology. **Carbohydrate Polymers**, v. 12, p. 375-392, 1992.

TIPTON, K. F. Principles of enzyme assay and kinetic studies. In: EISENTHAL, R; DANSON, M. J. **Enzymes Assays: A Practical Approach**. Oxford: Irl Press, p. 1-53, 1992.

THOMAS, D. J; ATWELL, W. A. **Starch**. 1. ed. St. Paul: Eagan Press, 1999.

VAN DER VEEN, B. A; VAN ALEBEEK, G. J. W. M; UIDEHAAGE, J. C. M; DISKSTRA, B. W; DISJKHUIZEN, L. The three from *Bacillus circulans* (strain 521) proceed via different kinetic mechanisms. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 658-665, 2000.

WOLF, M. J. Wheat starch; Isolation. IN: WHISTLER, R. L. **Methods in carbohydrate chemistry**; Starch. New York. Academic Press, v. 4, p. 7-8, 1964.

YONEMOTO, P. G; CALORI-DOMINGUES, M. A; FRANCO, C. M. L. Effect of granule size on the structural and physicochemical characteristics of wheat starch. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 761-771, 2007.

YU, E. K. C; AOKI, H; MISAWA, M. Specific alpha-cyclodextrin production by a novel thermostable cyclodextrin glycosyltransferase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 377-379, 1988.

ZOBEL, H. F; KULP, K. The staling mechanism. IN: HEBEDA, R.E; ZOBEL, H. F. **Baked goods freshness**. New York. Marcel Dekker, p. 1-64, 1996.

CAPÍTULO V  
APLICAÇÃO DA XILANASE E CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE (CGTase) NA  
PRODUÇÃO DE PÃES

SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>135</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>136</b>
<b>5.1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>137</b>
<b>5.2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>138</b>
5.2.1. MATERIAL .....	138
5.2.2. MÉTODOS .....	138
5.2.2.1. <b>Ação da xilanase e CGTase nas características reológicas e nas propriedades térmicas da farinha de trigo .....</b>	<b>138</b>
5.2.2.1.1. Propriedades farinográficas .....	139
5.2.2.1.2. Propriedades extensográficas .....	139
5.2.2.1.3. Propriedades de pasta.....	139
5.2.2.1.4. Propriedades térmicas .....	139
5.2.2.2. <b>Produção de pão .....</b>	<b>139</b>
5.2.2.2.1. Método de panificação.....	139
5.2.2.2.2. Avaliação do volume e pH da massa .....	140
5.2.2.2.3. Avaliação do volume do pão.....	140
5.2.2.3. <b>Estudo do envelhecimento do pão.....</b>	<b>140</b>
5.2.2.3.1. Conteúdo de água do miolo e da crosta do pão.....	140
5.2.2.3.2. Avaliação da firmeza do miolo do pão .....	140
5.2.2.3.3. Retrogradação da amilopectina do miolo do pão .....	140
5.2.2.4. <b>Análise estatística .....</b>	<b>140</b>
<b>5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>104</b>
5.3.1. <b>AÇÃO DA XILANASE E CGTase NAS CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DA FARINHA DE TRIGO .....</b>	<b>140</b>
5.3.1.1. <b>Propriedades farinográficas .....</b>	<b>141</b>
5.3.1.2. <b>Propriedades extensográficas .....</b>	<b>141</b>
5.3.1.3. <b>Propriedades de pasta.....</b>	<b>142</b>
5.3.2. <b>AÇÃO DA XILANASE, CGTase E XILANASE/CGTase NAS CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DA MASSA E DO PÃO.....</b>	<b>143</b>
5.3.2.1. <b>Avaliação do volume e pH da massa .....</b>	<b>143</b>

5.3.2.2. Avaliação do volume do pão.....	144
5.3.3. AÇÃO DA XILANASE, CGTase E XILANASE/CGTase NO ENVELHECIMENTO DO PÃO .....	144
5.3.3.1. Conteúdo de água do miolo e da crosta do pão.....	144
5.3.3.2. Avaliação da firmeza do miolo do pão.....	146
5.3.3.3. Retrogradação da amilopectina do miolo do pão.....	147
5.4. CONCLUSÕES .....	148
5.5. REFERÊNCIAS .....	148
<b>CONCLUSÕES FINAIS</b>	

## LISTA DE FIGURAS

5.1. Perfil viscoamilográfico das farinhas de trigo adicionadas de xilanase e/ou CGTase parcialmente purificadas .....	143
5.2. Efeito da xilanase, CGTase e xilanase/CGTase parcialmente purificadas sobre o volume específico do pão .....	144
5.3. Efeito da xilanase, CGTase e xilanase/CGTase parcialmente purificada sobre a firmeza do miolo durante o armazenamento do pão a 4 °C .....	146
5.4. Efeito da xilanase, CGTase e da xilanase/CGTase parcialmente purificadas sobre a entalpia de retrogradação do miolo do pão durante o armazenamento a 4°C .....	147

## LISTA DE TABELAS

5.1. Efeito da xilanase e CGTase parcialmente purificadas sobre as características farinográficas da farinha de trigo. ....	141
5.2. Efeito da xilanase e CGTase parcialmente purificadas sobre as características extensográficas da farinha de trigo.....	141
5.3. Efeito da xilanase, CGTase e xilanase/CGTase parcialmente purificadas sobre as propriedades de pasta <sup>1</sup> da farinha de trigo.....	142
5.4. Efeito da xilanase, CGTase e xilanase/CGTase parcialmente purificadas sobre o volume e pH da massa. ....	143
5.5. Conteúdo de água do miolo dos pães controle e adicionados de xilanase, CGTase e xilanase/CGTase parcialmente purificada .....	145
5.6. Conteúdo de água da crosta dos pães controle e adicionados de xilanase, CGTase e xilanase/CGTase parcialmente purificada .....	145

## 5.1. Introdução

A perda econômica resultante do envelhecimento do pão incentiva as pesquisas que visam controlar ou até mesmo retardar o processo de envelhecimento desses produtos.

Durante o resfriamento e o armazenamento, novas interações ocorrem na fração do amido e as moléculas de amilose e de amilopectina reassociam-se dentro de estruturas mais ordenadas, aumentando sua cristalinidade. Alguns pesquisadores relacionam a firmeza do miolo com as transformações que ocorrem no amido, principalmente a formação de estruturas em dupla hélice e aumento das regiões cristalinas (ZOBEL; KULP, 1996; GRAY; BEMILLER, 2003).

Segundo Cairns; Miles; Morris, (1991) mono e dissacarídeos como a xilose, maltose, ribose e frutose, provocaram a redução da taxa de retrogradação do amido. Miyazaki et al, (2004), observaram que dextrinas de menor massa molecular também reduziram a retrogradação da amilopectina, podendo ser usadas como um agente antienvelhecimento.

Componentes menores da farinha de trigo como os polissacarídeos não-amiláceos também conhecidos como fibras e constituídos principalmente pelas arabinoxilanas (AX),  $\beta$ -glucanas e peptídios-arabinogalactanas contribuem significativamente para a qualidade dos produtos a base de trigo (COURTIN; DELCOUR, 2002; GOESAERT et al., 2009).

Muito tem sido feito no sentido de minimizar os efeitos negativos que o processo de envelhecimento causa durante o armazenamento de pães. O uso de emulsificantes (STAMPFLI; NERSTEN, 1995), hidrocolóides (GUARDA et al., 2004), e mais recentemente a utilização de enzimas têm se destacado como um caminho promissor para a melhoria da qualidade de produtos panificáveis. Entre as enzimas amplamente estudadas que alteram as propriedades do amido ou dos polissacarídeos não amiláceos, para melhorar as características da massa melhorando a qualidade dos pães e minimizando os efeitos do processo de envelhecimento destacam-se as  $\alpha$ -amilases (Defloor; Delcour, 1999), xilanases (Courtin; Delcour, 2002; Haros et al., 2002; Jiang et al., 2005) e as CGTases (Martin; Hosney, 1991; Chung et al., 1998).

As amilases são rotineiramente usadas em panificação como um agente antienvelhecimento (GOESAERT et al., 2005). Uma amilase pouco estudada é a ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). Essa enzima é capaz de hidrolisar o amido em uma série de dextrinas cíclicas não-reduzidas contendo seis ( ), sete ( ) e oito ( ) unidades de glicose, respectivamente, que são unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,4), além da produção de dextrinas de baixo peso molecular (Courtin; Delcour, 2001). Há relatos na literatura de que uma CGTase termoestável isolada de *Bacillus stearothermophilus* ET1 (CGTase ET1) produz vários maltooligossacarídeos que atuam como potente agente antienvelhecimento no pão (CHUNG et

al., 1998). Também foi relatado que o volume do pão aumentou devido à ação de dextrinas produzidas pela CGTase adicionada à massa do pão (GUJRAL et al., 2003).

Outra enzima estudada para melhorar a qualidade de pães é a xilanase. Essa enzima hidrolisa as ligações glicosídicas -1,4 entre as unidades de xilopiranosil da cadeia principal das arabinoxilanas, liberando, xilose, xilobiose e oligossacarídeos (COURTIN; DELCOUR, 2002). Alguns trabalhos sobre aplicação de xilanase em panificação mostraram um aumento no volume específico dos pães e uma diminuição na firmeza do miolo durante o período de armazenamento (JIANG et al., 2005; JIANG; BAIL; WU, 2007).

O conhecimento dos efeitos da xilanase termoestável fúngica e da CGTase bacteriana em conjunto na fabricação de pães é ainda incompleto, no que diz respeito ao melhoramento da qualidade da massa e ao processo de envelhecimento do pão. A aplicação em panificação de xilanase termoestável fúngica (Capítulo III) e CGTase bacteriana (Capítulo IV) em suas formas isoladas, aumentou significativamente o volume específico do pão e também a vida de prateleira pela redução da firmeza do miolo e redução da retrogradação da amilopectina durante o armazenamento, podendo ser aplicadas como enzimas antienvelhecimento. Deste modo, este trabalho teve por objetivo estudar o efeito conjunto da aplicação dessas duas enzimas na qualidade da massa e do pão e também seu efeito no processo de envelhecimento do mesmo.

## **5.2. Material e Métodos**

### **5.2.1. Material**

Farinha de trigo obtida da moagem de grãos duros, adequada para produção de pão, gentilmente doada pelo moinho Sete Irmãos (Uberlândia, Brasil) foi usada neste trabalho. Outros ingredientes para confecção dos pães foram obtidos do comércio local (São José do Rio Preto, Brasil). Todos os outros reagentes utilizados foram puros para análise.

As enzimas utilizadas neste estudo foram a xilanase produzida por meio de fermentação sólida pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 e a ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) produzida por meio de fermentação submersa pela bactéria *Bacillus clausii* E16, parcialmente purificadas. Os dois extratos enzimáticos eram livres das enzimas amilolíticas  $\alpha$ -amilase e glucoamilase.

### **5.2.2. Métodos**

#### **5.2.2.1. Ação da xilanase e CGTase nas características reológicas da farinha de trigo**

Nos capítulos III e IV, verificou-se que as concentrações adequadas de xilanase e CGTase usadas individualmente no preparo dos pães foi de 35U e 30U por 100 g de farinha de trigo, respectivamente. Assim, neste trabalho, estas concentrações foram escolhidas baseadas nos resultados dos capítulos anteriores.

#### **5.2.2.1.1. Propriedades farinográficas**

As características reológicas da farinha de trigo controle e adicionadas de xilanase (35U/100 g de farinha) e/ou CGTase (30U/100 g de farinha) parcialmente purificadas foram determinadas utilizando as mesmas metodologias usadas para o estudo com a xilanase e CGTase.

Esta análise foi realizada de acordo com o método descrito em 3.3.2.4.1

#### **5.2.2.1.2. Propriedades extensográficas**

Esta análise foi realizada de acordo com o método descrito em 3.3.2.4.2.

#### **5.2.2.1.3. Propriedades de pasta**

Esta análise foi realizada de acordo com o método descrito em 3.3.2.4.3.

#### **5.2.2.1.4. Propriedades térmicas**

Esta análise foi realizada de acordo com o método descrito em 3.3.2.4.4.

### **5.2.2.2. Produção de pão**

#### **5.2.2.2.1. Método de panificação**

Neste experimento as melhores concentrações de xilanase (35U/100 g de farinha) e CGTase (30U/100 g de farinha) obtidos nos experimentos anteriores foram adicionadas no pão separadamente e em conjunto. A quantidade de água adicionada foi determinada de acordo com a absorção de água da farinha determinada em farinógrafo (Brabender) e descrita no laudo técnico da farinha, fornecido pelo Moinho Sete Irmãos. A xilanase (30U/100 g de farinha) e/ou ciclodextrina glicosiltransferase (30U/100 g de farinha) foram adicionadas na água para garantir o amplo acesso em toda massa.

O método de panificação foi realizado de acordo com o método descrito em 3.3.2.5.1.

#### **5.2.2.2.2. Avaliação do volume e pH da massa**

Esta análise foi realizada de acordo com o método descrito em 3.3.2.5.2.

#### **5.2.2.2.3. Avaliação do volume do pão**

Esta análise foi realizada de acordo com o método descrito em 3.3.2.5.3.

#### **5.2.2.3. Estudo do envelhecimento do pão**

Para o estudo do envelhecimento, os pães após o forneamento foram resfriados a temperatura ambiente por 2 horas antes de serem armazenados em embalagens de polietileno e estocados a 4°C por 10 dias. As análises do conteúdo de água, firmeza e de retrogradação da amilopectina dos pães controle e adicionados de xilanase e/ou CGTase parcialmente purificadas foram realizadas nos dias 0, 3, 5, 7 e 10. Durante esse tempo, os pães foram armazenados a uma temperatura de 4°C. Os pães foram mantidos à temperatura ambiente por 30 minutos antes de serem analisados.

##### **5.2.2.3.1. Conteúdo de água do miolo e da crosta do pão**

Esta análise foi realizada de acordo com o método descrito em 3.3.2.6.1.

##### **5.2.2.3.2. Avaliação da firmeza do miolo do pão**

Esta análise foi realizada de acordo com o método descrito em 3.3.2.6.2.

##### **5.2.2.3.3. Retrogradação da amilopectina do miolo do pão**

Esta análise foi realizada de acordo com o método descrito em 3.3.2.6.3.

#### **5.2.2.4. Análise estatística**

Esta análise foi realizada de acordo com o método descrito em 3.3.2.8.

### **5.3 Resultados e discussão**

#### **5.3.1 Ação da xilanase e CGTase nas características da farinha de trigo**

### 5.3.1.1. Propriedades farinográficas

Os parâmetros farinográficos das farinhas controle e das adicionadas de xilanase e CGTase parcialmente purificadas estão representados na **Tabela 5.1**.

A farinha controle apresentou uma porcentagem de absorção de água, estabilidade, índice de tolerância a mistura (I.T.M) e tempo de desenvolvimento específicos de farinha forte, ideal para a produção de pães, como já relatado neste trabalho.

Não houve alteração na absorção de água pela farinha quando esta foi adicionada de xilanase e CGTase. Com relação ao tempo de desenvolvimento houve um leve aumento quando xilanase e CGTase foram adicionadas concomitantemente. A estabilidade das massas também aumentou em relação à massa controle, e não houve qualquer alteração no I.T.M (**Tabela 5.1**).

**Tabela 5.1.** Efeito da xilanase e CGTase parcialmente purificadas sobre as características farinográficas da farinha de trigo.

<i>Farinha</i>	<i>Absorção (%)</i>	<i>Tempo de desenvolvimento (min)</i>	<i>Estabilidade (min)</i>	<i>Índice de tolerância a mistura (UF)</i>
<i>Controle</i>	60,5	12,0	9,5	30
<i>Xilanase/CGTase</i>	60,0	13,5	12,2	30

\* Xilanase (35U) e CGTase (30U) (U/100g farinha de trigo).

A adição das duas enzimas em conjunto, em geral melhorou as características reológicas da farinha, promovendo seu fortalecimento.

### 5.3.1.2. Propriedades extensográficas

Os parâmetros extensográficos das farinhas controle e das adicionadas de xilanase e CGTase parcialmente purificadas estão representados na **Tabela 5.2**.

**Tabela 5.2.** Efeito da xilanase e CGTase parcialmente purificadas sobre as características extensográficas da farinha de trigo.

<i>Farinha</i>	<i>Resistência (E.U.)</i>	<i>Resistência máxima (U.E.)</i>	<i>Extensibilidade (min)</i>	<i>Número proporcional (R/E)</i>
<i>Controle</i>	520	700	135	3,8
<i>Xilanase/CGTase*</i>	> 1000	> 1000	85	> 10

\* Xilanase (35U) e CGTase (30U) (U/100g farinha de trigo).

\*\* Parâmetros extensográficos após 135 minutos de fermentação.

A farinha controle apresentou os parâmetros de resistência à extensão, extensibilidade e de número proporcional, específicos de farinha forte, como já relatado neste trabalho.

Os parâmetros extensográficos das massas adicionadas de xilanase e CGTase foram alterados. A resistência (elasticidade) e a resistência máxima aumentaram em relação à massa controle e a extensibilidade reduziu, aumentando então o número proporcional.

Estes resultados indicam um fortalecimento da farinha quando as enzimas foram utilizadas em conjunto, tornando a massa mais adequada para produção de produtos fermentáveis como o pão, por permitir que a massa se expanda durante a fermentação sem que ocorram grandes deformações na mesma.

### 5.3.1.3. Propriedades de pasta

As propriedades de pasta da farinha de trigo controle e das adicionadas de xilanase e/ou CGTase parcialmente purificadas foram determinadas por meio do RVA e estão apresentadas na **Tabela 5.3**.

**Tabela 5.3.** Efeito da xilanase, CGTase e xilanase/CGTase parcialmente purificadas sobre as propriedades de pasta<sup>1</sup> da farinha de trigo.

Farinha	T. pasta (°C)	Pico viscosidade	Viscosidades (RVU)		
			Quebra	Viscosidade final	Setback
Controle	87,2 ± 0,0	235 ± 0,5	97,1 ± 0,7	270 ± 2,3	124 ± 2,6
35U xilanase*	87,3 ± 0,3	235 ± 0,2	93,5 ± 2,2	270 ± 3,4	123 ± 0,5
30U CGTase*	86,3 ± 0,0	189 ± 2,1	73,5 ± 3,3	236 ± 2,0	122 ± 1,5
Xilanase/CGTase*	86,3 ± 0,0	190 ± 0,9	74,8 ± 3,1	234 ± 1,2	120 ± 1,0

<sup>1</sup>Média de duas replicatas.

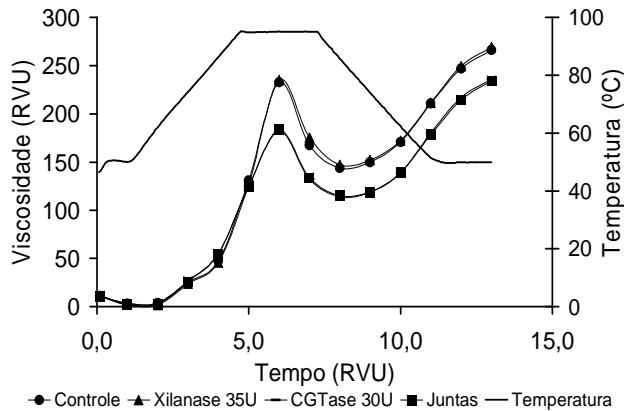
\* Xilanase e/ou CGTase (U/100g farinha de trigo).

A adição de xilanase (35U/100 g de farinha) não alterou as propriedades de pasta da farinha, como já observado neste trabalho, quando a ação da xilanase em diferentes concentrações nas propriedades de pasta foi avaliada (Capítulo III). Novamente a enzima amilolítica CGTase (30U) reduziu os picos de viscosidade, viscosidade final e tendência a retrogradação (*setback*) da farinha, também já observado neste trabalho (Capítulo IV) (**Tabela 5.3**).

Com a adição das duas enzimas em conjunto, a redução dos picos de viscosidade, viscosidade final e tendência a retrogradação (*setback*) foram praticamente os mesmos dos observados quando apenas a CGTase estava presente (**Tabela 5.3 e Figura 5.1**).

Estes dados indicam claramente que as alterações observadas na farinha adicionadas com as enzimas em conjunto são atribuídas somente a CGTase, em função da degradação do

amido presente em moléculas menores, causando a redução da viscosidade de pasta e da retrogradação da amilose.



**Figura 5.1.** Perfil viscoamilográfico das farinhas de trigo adicionadas de xilanase e/ou CGTase parcialmente purificadas.

### 5.3.2. Ação da xilanase, CGTase e xilanase/CGTase nas características tecnológicas da massa e do pão

#### 5.3.2.1. Avaliação do volume e pH da massa

O aumento do volume das massas durante a fermentação e o pH das massas controle e adicionadas de xilanase, CGTase e xilanase/CGTase parcialmente purificadas estão apresentados na **Tabela 5.4**.

**Tabela 5.4.** Efeito da xilanase, CGTase e xilanase/CGTase parcialmente purificadas sobre o volume e pH da massa.

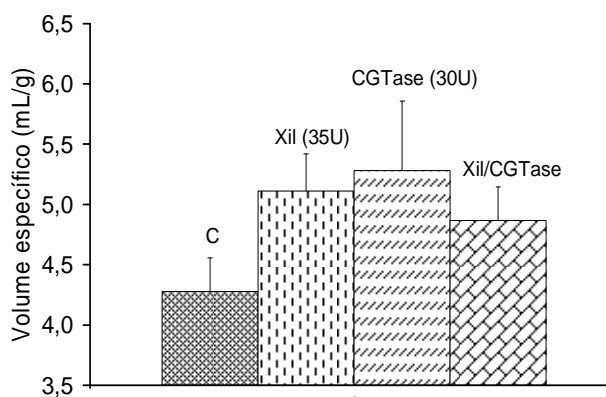
<i>Massa</i>	<i>Volume (%)</i>	<i>Aumento (%)</i>	<i>pH</i>
<i>Controle</i>	230		5,3
<i>35U xilanase*</i>	270	(+17%)	5,1
<i>30U CGTase*</i>	283 (+23%)	(+23%)	5,3
<i>Xilanase/CGTase*</i>	250	(+9%)	5,0

\*Xilanase (35U) e/ou CGTase (30U) (U/100g farinha de trigo).

Como também observado anteriormente neste trabalho, as massas adicionadas de xilanase e CGTase individualmente apresentaram volume superior ao da massa controle (Capítulo III e IV). Quando essas enzimas foram adicionadas em conjunto, o volume dessa massa também foi superior ao volume da massa controle, porém inferior àqueles das massas adicionadas de xilanase e CGTase separadamente (**Tabela 5.4**).

### 5.3.2.2. Avaliação do volume do pão

O volume específico dos pães controle e dos adicionados de xilanase, CGTase e xilanase/CGTase parcialmente purificadas está apresentado na **Figura 5.2**. Os pães adicionados de xilanase (35U/100 g de farinha) e CGTase (30U/100 g de farinha) apresentaram um volume 19% e 23% superiores ao dos pães controle, respectivamente. No entanto, quando essas enzimas foram adicionadas em conjunto, o volume dos pães foi 14% superior aos volumes dos pães controle.



**Figura 5.2.** Efeito da xilanase, CGTase e xilanase/CGTase parcialmente purificadas sobre o volume específico do pão. (U/100g farinha de trigo).

Novamente como observado nas análises dos volumes das massas, a adição das duas enzimas em conjunto melhorou o volume dos pães em relação ao controle, mas não houve um efeito positivo em conjunto dessas enzimas sobre o volume dos pães. [Martinez-Anaya e Jimenez \(1997\)](#), usando uma combinação de pentosanase/amilase comercial em pães observaram uma aumento significativo no volume específico desses pães em relação aos pães controles.

### 5.3.3. Ação da xilanase, CGTase e xilanase/CGTase no envelhecimento do pão

#### 5.3.3.1. Conteúdo de água do miolo e da crosta do pão

As **Tabelas 5.5 e 5.6** apresentam o conteúdo de água do miolo e da crosta dos pães adicionados de xilanase, CGTase e xilanase/CGTase parcialmente purificadas.

No presente estudo, o conteúdo de água do miolo dos pães frescos esteve em torno de 39%, exceto para os pães adicionados de xilanase que apresentaram um conteúdo de água do miolo menor, em torno de 36%. Durante o armazenamento houve uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no conteúdo de água do miolo dos pães controle e dos adicionados de xilanase até o

décimo dia, enquanto que para os pães adicionados de CGTase e xilanase/CGTase houve uma redução significativa ( $p<0,05$ ) no conteúdo de água do miolo desses pães apenas até o quinto dia de armazenamento. No entanto, ao final de dez dias não foi observado uma diferença significativa ( $p<0,05$ ) no conteúdo de água do miolo desses. Todos apresentaram um teor de unidade em torno de 35%. Por outro lado, no último dia de armazenamento dos pães controle e aqueles adicionados de xilanase, a umidade do miolo foi menor e em torno de 30% (Tabela 5.5.).

**Tabela 5.5.** Conteúdo de água do miolo dos pães controle e adicionados de xilanase, CGTase e xilanase/CGTase parcialmente purificada.

<i>Xilanase (U/100g de farinha de trigo)</i>	<i>Conteúdo de água do miolo %</i>				
	Dia 0	Dia 3	Dia 5	Dia 7	Dia 10
Controle	39,78 ± 0,54 <sup>aA</sup>	34,38 ± 0,34 <sup>aB</sup>	33,95 ± 0,47 <sup>aB</sup>	33,58 ± 0,65 <sup>aB</sup>	31,83 ± 0,32 <sup>bC</sup>
Xilanase	36,24 ± 0,31 <sup>cA</sup>	34,34 ± 0,99 <sup>aAB</sup>	32,37 ± 0,86 <sup>bB</sup>	32,17 ± 1,03 <sup>aBC</sup>	29,93 ± 0,87 <sup>cC</sup>
CGTase	39,16 ± 0,56 <sup>abA</sup>	35,91 ± 0,74 <sup>aB</sup>	34,06 ± 0,57 <sup>aC</sup>	33,85 ± 0,46 <sup>aC</sup>	34,46 ± 0,87 <sup>aBC</sup>
Xilanase/CGTase	38,01 ± 0,62 <sup>bA</sup>	34,98 ± 0,81 <sup>aB</sup>	33,07 ± 0,18 <sup>abC</sup>	33,74 ± 0,38 <sup>aBC</sup>	34,53 ± 0,52 <sup>aBC</sup>

\*Valores seguidos pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey.

\*\*Valores seguidos pela mesma letra maiúscula na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey. ( $p<0,05$ ).

Xilanase, *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756; CGTase, *Bacillus clausii* E16.

Durante o armazenamento houve um aumento significativo ( $p<0,05$ ) no conteúdo de água da crosta de todos os pães até o quinto dia, exceto para aqueles adicionados de xilanase/CGTase que mostraram um aumento progressivo até o sétimo dia. Ao final de dez dias de armazenamento, não foi observado diferença significativa ( $p<0,05$ ) no conteúdo de água da crosta de todos os pães, que apresentaram valores em torno de 26% (Tabela 5.6).

**Tabela 5.6.** Conteúdo de água da crosta dos pães controle e adicionados de xilanase, CGTase e xilanase/CGTase parcialmente purificada.

<i>Xilanase (U/100g de farinha de trigo)</i>	<i>Conteúdo de água da crosta %</i>				
	Dia 0	Dia 3	Dia 5	Dia 7	Dia 10
Controle	21,21 ± 0,40 <sup>aC</sup>	23,55 ± 0,64 <sup>aB</sup>	25,58 ± 0,68 <sup>aA</sup>	26,35 ± 0,47 <sup>abA</sup>	26,96 ± 0,25 <sup>aA</sup>
Xilanase	21,59 ± 0,91 <sup>aC</sup>	23,49 ± 0,58 <sup>aB</sup>	25,96 ± 0,71 <sup>aA</sup>	25,62 ± 0,37 <sup>bA</sup>	26,35 ± 0,42 <sup>aA</sup>
CGTase	18,93 ± 0,83 <sup>bC</sup>	24,83 ± 0,47 <sup>aB</sup>	26,02 ± 0,25 <sup>aAB</sup>	26,66 ± 0,50 <sup>abA</sup>	27,06 ± 0,88 <sup>aA</sup>
Xilanase/CGTas	18,68 ± 0,52 <sup>bD</sup>	24,28 ± 0,66 <sup>aC</sup>	25,29 ± 0,42 <sup>aBC</sup>	27,10 ± 0,50 <sup>aA</sup>	26,71 ± 0,60 <sup>aA</sup>

\*Valores seguidos pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey.

\*\*Valores seguidos pela mesma letra maiúscula na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey. ( $p<0,05$ ).

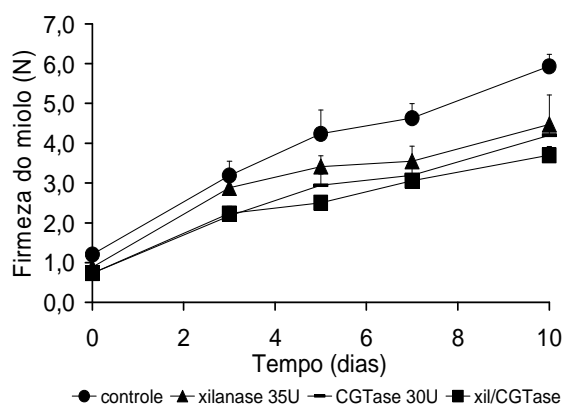
Xilanase, *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756; CGTase, *Bacillus clausii* E16.

Em todas as amostras, durante o armazenamento, a umidade do miolo reduziu e a umidade da crosta aumentou, indicando migração de água do miolo para a crosta.

### 5.3.3.2. Avaliação da firmeza do miolo do pão

A firmeza do miolo dos pães controle e dos adicionados de xilanase, CGTase e xilanase/CGTase parcialmente purificadas está apresentada na **Figura 5.3**.

Durante todo o período de armazenamento houve um aumento da firmeza do miolo para todas as amostras estudadas. Até o terceiro dia a firmeza do miolo dos pães controle e dos adicionados de xilanase foi semelhante, mas a partir deste dia de armazenamento ficou evidente o efeito antienvelhecimento dessa enzima. O efeito antienvelhecimento da CGTase e da xilanase/CGTase pode ser observado desde o primeiro dia de armazenamento. Ao final do período de armazenamento, os pães adicionados de xilanase, CGTase e xilanase/CGTase mostraram uma redução na firmeza do miolo de 25%, 29% e 38%, respectivamente. Nesta análise ficou claro o efeito positivo em conjunto das enzimas em relação à redução da firmeza desses pães (**Figura 5.3**)



**Figura 5.3.** Efeito da xilanase, CGTase e xilanase/CGTase parcialmente purificada sobre a firmeza do miolo durante o armazenamento do pão a 4 °C. Xilanase e/ou CGTase (U/100 g farinha de trigo).

[Martínez-Anaya e Jiménez, \(1997\)](#), verificaram uma redução entre 40 e 60% na firmeza do miolo dos pães durante o processo de envelhecimento, quando estes foram adicionados de uma combinação de várias pentosanases e amilases comerciais.

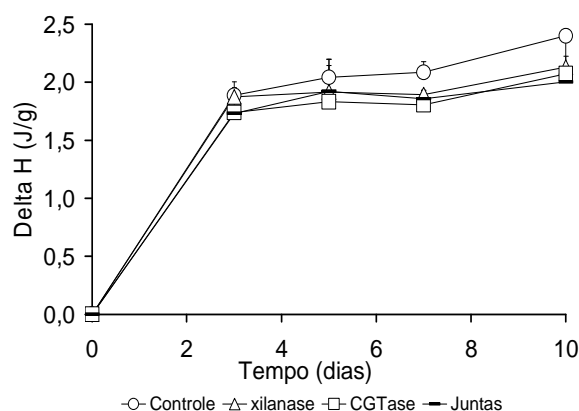
De acordo com [Armero; Collar, \(1998\)](#), a firmeza do miolo durante o armazenamento depende principalmente da firmeza inicial do miolo do pão fresco. Neste trabalho não foi observado diferenças consideráveis na firmeza inicial do miolo em nenhuma amostra estudada, mas houve uma alteração na firmeza do miolo durante o processo de envelhecimento.

A CGTase apresenta uma atividade ótima na temperatura de 55°C, apresentando assim uma melhor atividade catalítica durante a etapa de fermentação da massa. Por outro lado, a xilanase apresenta uma atividade ótima na temperatura de 75°C e assim, poderia atuar mais efetivamente durante a etapa de forneamento. Deste modo, estes resultados sugerem que poderia haver uma atuação enzimática durante todas as etapas do processamento dos pães.

As análises de suscetibilidade da xilanase e da CGTase sobre seus respectivos substratos (arabinoxilana e amido), apresentados nos capítulos III e IV (**Figuras 3.3, 3.5 e Tabelas 4.7 e 4.8**) mostraram a degradação desses substratos em moléculas de menor massa molecular. Assim, a redução mais pronunciada da firmeza do miolo nos pães adicionados das duas enzimas em conjunto, indica um efeito antivenhecimento sinérgico dos produtos liberados pelas enzimas estudadas.

### 5.3.3.3 Retrogradação da amilopectina do miolo do pão

As entalpias de retrogradação ( $\Delta H_r$ ) da amilopectina do miolo dos pães controle e dos adicionados de xilanase, CGTase e xilanase/CGTase parcialmente purificada estão apresentadas na **Figura 5.4**.



**Figura 5.4.** Efeito da xilanase, CGTase e da xilanase/CGTase parcialmente purificadas sobre a entalpia de retrogradação do miolo do pão durante o armazenamento a 4°C.

Nos três primeiros dias de armazenamento, o aumento da variação na entalpia de retrogradação ( $\Delta H_r$ ) foi linear e semelhante para todas as amostras estudadas. A diferença na entalpia de retrogradação ( $\Delta H_r$ ) dos pães com enzimas em relação aos pães controle ficou mais evidente a partir do quinto dia de armazenamento. Ao final do experimento, a redução da taxa de retrogradação dos pães adicionados de xilanase, CGTase e das duas enzimas juntas foi de 11%, 14% e 17% em relação ao controle, respectivamente (**Figura 5.4**).

Um pequeno efeito positivo em conjunto das enzimas foi observado, no entanto muito inferior àquele observado para a firmeza do miolo.

A relação entre retrogradação do amido e envelhecimento do pão está baseada na observação comum de que a taxa de retrogradação do amido está relacionada à firmeza do miolo durante o armazenamento do pão (CAUVAIN, 2007).

Neste trabalho, foi observada uma correlação positiva (0,88) entre a firmeza do miolo e a retrogradação da amilopectina. A produção de moléculas higroscópicas, principalmente xilose e xilobiose (Capítulo III) pela ação da xilanase; e glicose, maltose e maltooligossacarídeos com DP's de 3 a 5 (Capítulo IV) pela ação da CGTase melhorou a distribuição de água no pão e a presença dessas moléculas menores provavelmente causaram um impedimento estérico para a reorganização das moléculas de amilopectina.

## 5.4. Conclusão

A presença das enzimas xilanase e CGTase não causou um efeito em conjunto pronunciado nas características reológicas da farinha, no volume da massa e do pão, mas com relação aos pães controle pode-se observar que essas enzimas utilizadas em conjunto melhoraram a qualidade da massa e do pão.

Neste trabalho ficou claro o efeito positivo no envelhecimento dos pães, quando as enzimas em estudo foram adicionadas em conjunto. Esse efeito antienvelhecimento foi suportado pela forte redução na firmeza do miolo desses pães. Nesse experimento mostrou que os produtos liberados pela ação da xilanase (capítulo III) e os produtos liberados pela ação da CGTase (capítulo IV) podem atuar de forma complementar, reduzindo eficientemente a firmeza do miolo. Por outro lado, um pequeno efeito positivo em conjunto foi observado na retrogradação da amilopectina, mostrando que o envelhecimento do pão não está restritamente relacionado a este processo.

## 5.5. Referências

- ARMERO, E; COLLAR, C. Crumb firming kinetics of wheat breads with anti-staling additives. **Journal of Cereal Science**, v. 28, p. 165-174, 1998.
- CAIRNS, P; MILES, M. J; MORRIS, V. J. Studies of the effect of the sugars ribose, xylose and fructose on the retrogradation of wheat-starch gels by x-ray-diffraction. **Carbohydrate Polymers**, v 16, p. 355-365, 1991.
- CAUVAIN, S. P. **Bread making: improving quality**. Washington: Woodhead Publishing Limited, 2007.
- CHUNG, H.J, YOON, S.H, LEE, M.J, PARK, K.H. Characterization of a thermostable cyclodextrin glucanotransferase isolated from *Bacillus stearothermophilus* ET1. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 49, p. 952-959, 1998.
- COURTIN, C. M; DELCOUR, J. A. Relative activity endoxylanases towards water-extractable and unextractable arabinoxylan. **Journal of Cereal Science**. 33, p. 301–312, 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.

DEFLOOR, I, DELCOUR, J.A. Impact of maltodextrins and antistaling enzymes on the differential scanning calorimetry staling endotherm of baked bread doughs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 737-741, 1999.

GUARDA, A., ROSELL, C.M, BENEDITO, C, GALOTTO, M.J. Different hydrocolloids as bread improvers and antistaling agents. **Food Hydrocolloids**, v.18, p.241-247, 2004

GOESAERT, H; BRIJS, K; VERAVERBEKE, W. S; COURTIN, C. M; GEBRUERS, K; DELCOUR, J. A. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. **Food Science & Technology**, v.16, p.12-30, 2005.

GOESAERT, H., et al. Antifirming Effects of Starch Degrading Enzymes in Bread Crumb . **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 57, p. 2346-2355, 2009.

GUJRAL, H. S; GUARDIOLA, I; CARBONELL, J. V; ROSELL, C. M. Effect of Cyclodextrinase on Dough Rheology and Bread Quality from Rice Flour. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3814-3818, 2003.

HAROS, M; ROSELL, C. M; BENEDITO, C. Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling. **European Food Research and Technology**, v. 215, p. 425-430, 2002.

JIANG,Z; LI, X; YANG, S; LI, L; TAN, S. Improvement of the breadmaking quality of wheat flour by the hyperthermophilic xylanase B from *Thermotoga maritima*. **Food Research International**, v. 38, p.37-43, 2005.

JIANG, Z; BAIL, A. L; WU, A. Effect of the thermostable xylanase B (XynB) from *Thermotoga maritima* on the quality of frozen partially baked bread. **Journal of Cereal Science** (2007), doi:10.1016/j.jes.2007.03.013.

MARTIN, M. L.; HOSENEY, R. C. A mechanism of bread firming. II. Role of starch hydrolyzing enzymes. **Cereal Chemistry**, v. 68, p. 498-503, 1991.

MARTÍNEZ-ANAYA, M. A; JIMÉNEZ, T. Function of enzymes that hydrolyse starch and non-starch polysaccharide in breadmaking. **Z Lebensm Unters Forsch A**, v. 205, p. 209-214, 1997.

MIYAZAKI, M; MAEDA, T; MORITA, N. Effect of various dextrin substitutions for wheat flour on dough properties and bread qualities. **Food Research International**, v. 37, p. 59-65, 2004.

STAMPFLI, L, NERSTEN, B. Emulsifiers in bread making. **Food Chemistry**, v. 52, p. 353-360, 1995.

ZOBEL, H. F; KULP, K. The staling mechanism. IN: HEBEDA, R.E; ZOBEL, H. F. **Baked goods freshness**. New York. Marcel Dekker, p. 1-64, 1996.

## Conclusões Finais

- O substrato que resultou no melhor perfil enzimático para o uso em panificação foi o sabugo de milho, porque exibiu alta atividade xilanolítica e baixa atividade amilolítica e proteolítica.
- As características físico-químicas da xilanase sintetizada pelo *T. aurantiacus* CBMAI 756, revelou que a enzima tem um pH ótimo de 5,0, temperatura ótima de 75°C e permanece estável em uma ampla faixa de pH (4,0-10,0) e até 70°C.

- A xilanase aumentou significativamente o volume específico do pão. A especificidade da xilanase é pelas arabinoxilanas WU-AX. Esta enzima aumentou a vida de prateleira dos pães pela redução da firmeza do miolo e redução da retrogradação da amilopectina durante o armazenamento, podendo ser aplicada como uma enzima antienvelhecimento
- A CGTase aumentou o volume dos pães e reduziu a retrogradação da amilopectina e a firmeza do miolo, podendo ser usada como uma enzima antienvelhecimento. Observou-se claramente a atividade degradativa da CGTase frente ao amido de trigo e durante o processo de panificação. A CGTase estudada é uma  $\beta$ -CGTase.
- Ficou claro o efeito positivo no envelhecimento dos pães, quando as enzimas em estudo foram adicionadas em conjunto. Esse efeito foi suportado pela forte redução na firmeza do miolo desses pães. Os produtos liberados pela ação da xilanase e os produtos liberados pela ação da CGTase atuaram de forma complementar, reduzindo eficientemente a firmeza do miolo. Por outro lado, um pequeno efeito positivo em conjunto foi observado na retrogradação da amilopectina, mostrando que o envelhecimento do pão não está restritamente relacionado a este processo.