



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

Avaliação de enzimas microbianas para tratamento e adequação de farinhas de trigo em substituição ao uso de oxidantes químicos: Efeitos sobre as propriedades reológicas de dois perfis de farinha

Micheli Maria Bueno

**Porto Alegre
2016**

MICHELI MARIA BUENO

**AVALIAÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS PARA TRATAMENTO E
ADEQUAÇÃO DE FARINHAS DE TRIGO EM SUBSTITUIÇÃO AO USO DE
OXIDANTES QUÍMICOS: EFEITOS SOBRE AS PROPRIEDADES REOLÓGICAS
DE DOIS PERFIS DE FARINHA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Roberta Cruz Silveira Thys

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Bueno, Micheli Maria

Avaliação de enzimas microbianas para tratamento e adequação de farinhas de trigo em substituição ao uso de oxidantes químicos: Efeitos sobre as propriedades reológicas de dois perfis de farinha / Micheli Maria Bueno. -- 2016.

116 f.

Orientador: Rafael Costa Rodrigues.

Coorientadora: Roberta Cruz Silveira Thys.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Enzimas. 2. Farinha de trigo. 3. Reologia. 4. Oxidantes químicos. 5. Tratamento de farinhas. I. Rodrigues, Rafael Costa, orient. II. Thys, Roberta Cruz Silveira, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Autor: Micheli Maria Bueno (Tecnóloga em Alimentos – IFRS *Campus* Bento Gonçalves)

Título da dissertação: Avaliação de enzimas microbianas para tratamento e adequação de farinhas de trigo em substituição ao uso de oxidantes químicos: Efeitos sobre as propriedades reológicas de dois perfis de farinha

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de
MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em:/...../.....

Pela Banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Rafael C. Rodrigues
Docente do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
PPGCTA/UFRGS

Banca: Prof^a. Dr^a. Simone H. Flores
Doutora em Engenharia de Alimentos
PPGCTA /UFRGS

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Roberta C. S. Thys
Docente do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Dep. de Tecnologia de Alimentos /UFRGS

Homologado em:/...../.....
Por:

Banca: Prof^a. Dr^a. Carolina P. Kechinski
Doutora em Engenharia Química
Dep. de Nutrição/UFCSP

Prof^a. Dr^a. Rosane Rech
Coordenadora PPGCTA

Banca: Prof^a. Dr^a. Cláucia F. V. de Souza
Doutora em Biologia Celular e Molecular
PPGB/UNIVATES

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Diretor ICTA/UFRGS

Ao meu amor, pais, família e amigos.
Pelo amor e carinho, por quem sou e por tudo que alcancei

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me fazer persistir em meus sonhos.

Ao meu noivo Rodrigo, meu amor, que me deu força, apoio e carinho, e que nunca deixou de acreditar em mim. Obrigada por tudo!

Aos meus pais, Valdeci e Helena, pelo amor incondicional, por acreditarem em mim e torcerem pelo meu sucesso. Vocês são meu alicerce e esta vitória também é de vocês!

À minha família, principalmente meus tios Valmir e Maria, que me acolheram com tanto carinho.

Ao meu orientador, Rafael C. Rodrigues; primeiro por ter acreditado em mim, mas principalmente pelo diálogo aberto e por todo o conhecimento e atenção necessários durante o desenvolvimento deste projeto. Muito obrigada por ter me mostrado o caminho na área que escolhi! Você foi excepcional!

À minha co-orientadora Roberta C. S. Thys, pelo conhecimento e atenção, mas também pelos conselhos e incentivos que, mais do que acadêmicos, levarei para a vida. Muito Obrigada!

Aos meus professores, por sua imensurável contribuição.

Aos meus colegas de pós-graduação e de laboratório (Laboratórios 016 e 210), que contribuíram com discussões, apoio e, principalmente, amizade. Levo todos em meu coração.

À empresa Tondo S.A., que colaborou de forma muito importante, acreditando no projeto e fornecendo toda a matéria-prima e infraestrutura necessária. À toda a sua equipe, principalmente a coordenadora de P&D Agnes por ter acreditado no projeto e pelo intermédio junto a Tondo, e toda a equipe do Laboratório de Qualidade. Vocês foram fundamentais! Meu mais sincero Muito Obrigada!

À empresa Vallens Ingredientes Industriais Ltda., que colaborou de forma muito importante, pelos conhecimentos e experiência previamente adquiridos. Especialmente ao Diretor Rafael Marini, pelo apoio técnico, incentivo e por ter despertado o interesse na área que decidi seguir.

Ao PPGCTA do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS pela infraestrutura, oportunidades e apoio concedidos. E também a toda a sua equipe: Coordenação, técnicos e funcionários pelo auxílio e serviços prestados.

Agradeço à CAPES/FAPERGS pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a conclusão de mais esta etapa, meu mais sincero: Muito Obrigada!

“Algo só é impossível até que alguém duvide e resolva provar ao contrário” - Albert Einstein

RESUMO

No presente trabalho, avaliou-se os efeitos individuais e combinados de nove enzimas comerciais sobre as propriedades reológicas de massa das farinhas de trigo, com o objetivo de identificar seus efeitos sinérgicos ou antagônicos e as suas concentrações ótimas, como alternativa para substituição de oxidantes químicos no tratamento de farinhas. α -Amilases de origem fúngica (AMY-F), bacteriana (AMY-B) e maltogênica (AMY-M), xilanases fúngica (XYL-F) e bacteriana (XYL-B), glucose oxidase (GOX), lacase (LAC), lipase (LIP) e transglutaminase (TG) foram testadas em dois tipos de farinha: uma farinha forte padrão (farinha A) e uma farinha fraca comum (farinha B). Inicialmente, as enzimas foram adicionadas individualmente na farinha onde, seus efeitos sobre Falling Number (FN), farinografia e alveografia, foram avaliados variando-se suas concentrações de 25 - 833 U.kg⁻¹, a fim de se identificar as faixas de concentração ideais de cada uma delas. Identificou-se que as α -amilases afetaram principalmente as propriedades farinográficas, reduzindo a capacidade de absorção de água (WA) e tempo de estabilidade (ST) das massas. Para o ajuste de FN, AMY-B (150 U.kg⁻¹) foi mais eficiente que AMY-F (583 U.kg⁻¹) e AMY-M (583 U.kg⁻¹). As xilanases melhoraram o valor de W (10⁻⁴ J) e razão P/L, sendo que em todos os testes XYL-B foi mais eficiente do que XYL-F. Na concentração de 25 U.kg⁻¹, GOX e LAC melhoraram o ST, razão P/L e valor de W; no entanto, aumentaram o tempo de desenvolvimento (DT) das massas. LIP (150 U.kg⁻¹) promoveu a melhora no W e DT, enquanto que TG não apresentou efeitos significativos na maioria dos parâmetros avaliados. A partir disso, os efeitos combinados das enzimas foram avaliados através de dois planejamentos experimentais sequenciais. Para farinha A, a combinação enzimática ótima foi AMY-B (166 U.kg⁻¹), AMY-M (133 U.kg⁻¹), XYL-B (150 U.kg⁻¹), GOX (8 U.kg⁻¹) e LIP (150 U.kg⁻¹). Identificou-se um efeito sinérgico entre XYL-B e GOX na melhoria do W e razão P/L. Para a farinha B, a combinação enzimática ótima foi AMY-B (150 U.kg⁻¹), LIP (150 U.kg⁻¹), GOX (100 U.kg⁻¹) e LAC (200 U.kg⁻¹), sendo que GOX e LAC apresentaram um efeito cooperativo, quando usadas em concentrações opostas. As combinações enzimáticas foram mais eficientes do que a azodicarbonamida, cujo efeito, mesmo na concentração máxima (40 ppm) permitida pela legislação, não melhorou os parâmetros reológicos das massas. Foi demonstrado que é possível a substituição de oxidantes químicos por enzimas para o tratamento de farinhas, a fim de melhorar a reologia das massas, mesmo para uma farinha fraca, tornando-a adequada para panificação.

Palavras-chave: Enzimas; farinha de trigo; reologia; efeitos combinados; oxidantes químicos

ABSTRACT

In the present work, it was evaluated the individual and combined effects of nine commercial enzymes on the rheological properties of dough wheat flour, aiming to identify synergistic and antagonist effects between the enzymes and their optimal concentrations as substitutes of chemical oxidants. Fungal (AMY-F), bacterial (AMY-B) and maltogenic (AMY-M) α -amylases, fungal (XYL-F) and bacterial (XYL-B) xylanases, glucose oxidase (GOX), laccase (LAC), lipase (LIP) and transglutaminase (TG) were tested in two types of flour: standard strong flour (flour A) and common weak flour (flour B). Initially, Falling Number, farinography and alveography analysis were carried out varying the enzymes concentrations from 25 to 833 U.kg⁻¹, to identify the ideal ranges of each of them to improve the rheological characteristics of dough wheat flour. It was identified that α -amylases affected mainly the farinographic properties, reducing the water absorption (WA) and stability time (ST). AMY-B was the most effective enzyme for setting the FN, requiring 150 U.kg⁻¹, while for AMY-F and AMY-M it was necessary 583 U.kg⁻¹. In all tests, XYL-B was more efficient than XYL-F, but both improved the W (10⁻⁴ J) value and P/L ratio. At 25 U.kg⁻¹, GOX and LAC had important improves on the ST, P/L ratio and W value, however increased undesirably the development time (DT). LIP (150 U.kg⁻¹) promoted the improvement in W value and DT, while TG had not significant effects on most of the evaluated parameters. After that, the combined effects of enzymes were evaluated through two sequential experimental designs. For flour A, the optimal combination of enzymes was AMY-B (166 U.kg⁻¹), AMY-M (133 U.kg⁻¹), XYL-B (150 U.kg⁻¹), GOX (8 U.kg⁻¹) and LIP (150 U.kg⁻¹). It was identified a synergistic effect between XYL-B and GOX to improvement of W value (10⁻⁴ J) and the P/L ratio. For the flour B, the optimal combination of enzymes was AMY-B (150 U.kg⁻¹), LIP (150 U.kg⁻¹), GOX (100 U.kg⁻¹) and LAC (200 U.kg⁻¹). GOX and LAC presented a cooperative effect, when they were used at opposite concentrations. The enzymes mixtures were compared with chemical oxidant azodicarbonamide, and, even at the maximum concentration (40 ppm) allowed by Brazilian Health Surveillance Agency, the enzyme mixture was more effective. It was demonstrated that it is possible to perform the complete substitution of chemical oxidants by enzymes in order to adequate and improve the rheological parameters of dough wheat flours, even for a weak flour, making it suitable for bakery.

Keywords: enzymes; wheat flour; rheology; combined effects; chemical oxidants

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Farinograma típico obtido por análise em Farinógrafo Brabender.	23
Figura 2: Alveograma típico obtido por análise em Alveógrafo Chopin	25
Figura 3: Alveograma típico de uma farinha forte (panificação) e uma farinha fraca (biscoitos).	26
Figura 4: Representação esquemática das enzimas degradadoras de amido.	28

ARTIGO I

Figure 1: Effect of α -amylases concentration on Falling Number	58
---	----

ARTIGO II

Figure 1: Effects of GOX and AMY-M on (a) W value and (b) P/L ratio and GOX and XYL-B on (c) W value and (d) P/L ratio for flour A.....	90
Figure 2: Effects of AMY-B and LAC on (a) water absorption, (b) stability time, (c) W value and (b) P/L ratio for flour B.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características físico-químicas e reológicas das farinhas A e B após período de estabilização.	37
Tabela 2: Matriz de Plackett-Burman 11/12.	45
Tabela 3: Planejamento fatorial 2^3 completo.	46
Tabela 4: Variáveis e níveis estudados para a farinha A.	46
Tabela 5: Variáveis e níveis estudados para a farinha B.	47

ARTIGO I

Table 1: Enzymes characteristics and measured activities.....	57
Table 2: Concentration effects of amylases on rheological parameters of flour.....	59
Table 3: Concentration effects of fungal and bacterial xylanases on rheological parameters of flour.....	62
Table 4: Concentration effects of glucose oxidase and laccase on rheological parameters of flour.....	64
Table 5: Concentration effects of lipase and transglutaminase on rheological parameters of flour.....	66
Table 6: Comparison between ideal studied concentrations and supplier dosage recommended to each enzyme.....	68

ARTIGO II

Table 1: Matrix for Plackett-Burman experimental design and rheological parameters on flours A and B.....	82
Table 2: 2^3 Full factorial design for flour A and rheological effects.....	89
Table 3: Effects of XYL-B and GOX concentration to flour A.....	91
Table 4: 2^3 Full factorial design for Flour B and rheological effects.....	93
Table 5: Comparison of chemical and enzymatic treatment for flours A and B.....	95
Table 6: Table 6: Comparison between ideal studied concentrations and supplier dosage recommended to each enzyme.....	97

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	15
1. INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO II.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. Farinha	19
2.2. Características físico-químicas da farinha de trigo.....	20
2.2.1. Umidade	20
2.2.2. Cinzas.....	20
2.2.3. Cor	21
2.2.4. Índice de glúten	21
2.3. Características reológicas da massa de farinha de trigo.....	22
2.3.1. Falling Number	22
2.3.2. Farinografia	23
2.3.3. Alveografia.....	24
2.4. Aditivos químicos utilizados em farinhas de trigo	26
2.4.1. Azodicarbonamida (ADA).....	26
2.5. Enzimas	27
2.5.1. α -Amilases.....	28
2.5.1.1. α -Amilase fúngica	29
2.5.1.2. α -Amilase bacteriana	30
2.5.1.3. α -Amilase maltogênica	30
2.5.2. Xilanases	31
2.5.2.1. Xilanase fúngica	32
2.5.2.2. Xilanase bacteriana.....	32
2.5.3. Oxirredutases.....	32
2.5.3.1. Glicose oxidase.....	32
2.5.3.2. Lacase	33
2.5.4. Lipase	33
2.5.5. Transglutaminase	34
2.6. Combinações enzimáticas	34
CAPÍTULO III	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36

3.1. Materiais.....	36
3.1.1. Enzimas.....	36
3.1.2. Farinha.....	36
3.2. Métodos.....	37
3.2.1. Determinação da atividade de α -Amilases.....	37
3.2.2. Determinação da atividade de Xilanases.....	38
3.2.3. Determinação da atividade de Glicose oxidase.....	38
3.2.4. Determinação da atividade de Lacase.....	39
3.2.5. Determinação da atividade de Lipase.....	40
3.2.6. Determinação da atividade de Transglutaminase.....	40
3.3. Análises Físico-químicas.....	41
3.3.1. Umidade.....	41
3.3.2. Cinzas.....	41
3.3.3. Cor.....	42
3.3.4. Teor de glúten e Índice de glúten.....	42
3.4. Análises Reológicas.....	42
3.4.1. Falling Number (Número de queda).....	43
3.4.2. Farinografia.....	43
3.4.3. Alveografia.....	44
3.5. Efeitos da adição individual de enzimas nos parâmetros reológicos da farinha A....	44
3.6. Efeitos da adição combinada das enzimas nas farinhas A e B.....	44
3.6.1. Planejamento experimental Plackett-Burman.....	45
3.6.2. Planejamento Fatorial completo 2^3	45
3.7. Efeitos da aditivção química nos parâmetros reológicos das farinhas A e B.....	47
CAPÍTULO III – ARTIGO 1.....	48
CAPÍTULO IV – ARTIGO 2.....	73
CAPÍTULO V.....	102
5. DISCUSSÃO GERAL.....	102
CAPÍTULO VI.....	106
6. CONCLUSÃO.....	106
REFERÊNCIAS.....	108
APÊNDICE A – Gráficos de Pareto: Planejamento experimental Plackett-Burman farinha A.....	115

APÊNDICE B – Gráficos de Pareto: Planejamento experimental Plackett-Burman farinha B	
.....	116

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A importância tecnológica da farinha de trigo deve-se, principalmente, à capacidade de suas proteínas de formar uma massa viscoelástica, capaz de reter o CO₂ produzido durante a fermentação. Porém, esta capacidade também está relacionada a uma série de parâmetros químicos, físicos e reológicos que definem seu potencial (BELTON e TAYLOR, 2002). O conhecimento destas propriedades, através de testes reológicos como o Falling Number (atividade de α -amilase), a Farinografia e a Alveografia, permite prever algumas características dos produtos finais, além de estimar o comportamento das massas obtidas durante as etapas de produção e armazenamento, auxiliando na otimização de processos e no melhor aproveitamento e padronização de matérias-primas (STAUFFER, 1990; QUAGLIA, 1991).

Mesmo as farinhas com alto teor de proteínas formadoras de glúten (panificáveis) necessitam de ajustes para que se adequem perfeitamente à panificação, especialmente em relação a atividade da enzima α -amilase (Falling Number - FN), ajuste realizado através da adição de α -amilase comercial (GOESAERT et al., 2009; BARRERA et al., 2015). No entanto, a padronização do FN acaba afetando negativamente os parâmetros reológicos, causados principalmente pela hidrólise do amido, reduzindo a capacidade de absorção de água, viscosidade, estabilidade e resistência das massas, caracterizando o enfraquecimento da farinha (DUNNEWIND et al., 2002; LEMAN et al., 2005; BARRERA et al., 2015).

Como forma de minimizar estes efeitos secundários causados pela adição de α -amilase, geralmente a indústria moageira recorre à mesclas com farinhas de perfis tecnológicos diferentes e/ou aditivação química por meio da adição de agentes oxidantes, principalmente a azodicarbonamida (ADA) (BORZANI et al., 2001; CAUVAIN e NOVOZYMES, 2012; HUI e ZHOU, 2014).

O primeiro método, muitas vezes, torna-se demasiadamente oneroso, tendo em vista que nem sempre é possível atingir os parâmetros necessários somente pela mistura de diferentes farinhas, o que acaba por tornar este processo de tentativa e erro, caro e susceptível ao desperdício, além de dificultar a rastreabilidade dos produtos finais (CAUVAIN e NOVOZYMES, 2012). Já o segundo método, muitas vezes torna-se inviável, pois a aditivação química necessária poderia ultrapassar os limites considerados seguros estabelecidos pela legislação. Além disso, o uso da ADA tem sido amplamente associado a inúmeros problemas

de saúde e alergias, sendo sua utilização proibida em muitos países e passível de pesadas multas em caso de descumprimento (STADLER et al., 2004; NOONAN et al., 2008; YE et al., 2011; LERNER e MATTHIAS, 2015). Desta forma, o uso de enzimas apresenta-se como uma alternativa melhor à prática de mesclas e aos aditivos químicos, visto que as mesmas são altamente específicas e seguras a saúde (BORZANI et al., 2001; BON et al., 2008; MONDAL e DATTA, 2008).

Dentre as enzimas destinadas para o tratamento de farinhas, podem-se destacar as α -amilases, xilanases e lipases; as quais melhoram as propriedades de extensibilidade e maleabilidade das massas (GOESAERT et al., 2009; AHMAD et al., 2013; GERITS et al., 2014). Já enzimas como a glicose oxidase, a lacase e a transglutaminase, promovem o fortalecimento das massas através da formação de ligações dissulfeto e formação de ligações cruzadas na cadeia proteica, melhorando suas características de tenacidade e resistência (COLLAR e BOLLAIN, 2005; SELINHEIMO et al., 2006; CABALLERO et al., 2007; FLANDER et al., 2008; JOYE et al., 2009; STEFFOLANI et al., 2010).

Preparados enzimáticos comerciais, utilizados pela indústria em formulações de pães ou tratamento de farinhas, tipicamente possuem uma mistura destas enzimas, formada com base apenas nos efeitos individuais de cada uma sobre a reologia da massa, com o intuito de que, através de suas especificidades sobre cada fração da farinha, se obtenha uma melhora em todos os parâmetros reológicos. No entanto, quando usadas em conjunto, nem sempre seu padrão de comportamento e desempenho são os mesmos de quando empregadas individualmente, devendo-se, portanto, considerar os possíveis efeitos sinérgicos ou antagonistas entre estas enzimas.

A principal dificuldade de utilização de uma grande variedade de enzimas na correção de farinha, é o conhecimento ainda limitado sobre os seus efeitos combinados. Ao longo dos anos, alguns estudos têm evidenciado o comportamento sinérgico entre algumas delas, (PRIMO-MARTÍN e MARTÍNEZ-ANAYA, 2003; FIGUEROA-ESPINOZA et al., 2004; SELINHEIMO et al., 2006; CABALLERO et al., 2007; RENZETTI e ARENDT, 2009; STEFFOLANI et al., 2010; BUCHE et al., 2011), porém é prática comum a avaliação de duas enzimas de cada vez ou, quando muito, uma combinação de quatro delas, subestimando seu real potencial de uso.

Outra possibilidade de utilização de combinações enzimáticas, ainda pouco explorada, é o melhoramento de farinhas de baixa qualidade tecnológica, comercialmente designadas para fins de menor valor agregado do que a panificação, o que poderia permitir o aproveitamento da matéria-prima nacional.

Devido ao fato do Brasil não ser autossuficiente no abastecimento de trigo com qualidade tecnológica para panificação, o país depende de trigo importado para atender às suas necessidades internas (COSTA et al., 2008). Embora a região sul do país seja responsável por cerca de 92% da produção nacional, com o Paraná figurando como o maior produtor, devido as condições climáticas e de cultivo, a qualidade panificável do trigo é inferior ao importado, sendo geralmente classificados como trigos “fracos” (MONTENEGRO, 2011).

Dados da safra 2015/2016 (CONAB, 2016) apontam que, devido à instabilidade climática ao longo do desenvolvimento do grão e o excesso de chuvas durante todo o período da colheita, a qualidade e produtividade das lavouras foi afetada. Grande parte do trigo colhido apresentou cor não característica, Falling Number menor a 250 s (valor mínimo para uso na panificação), baixo valor de W (força de glúten) e pH inferior ao mínimo exigido, o que o inviabiliza para uso no seu fim principal, a produção de farinhas para pães.

De acordo com os dados disponibilizados pela CONAB (2016), os danos causados na safra, exigirão maior volume de importações, que poderá superar 5,75 milhões de toneladas, tornando o Brasil ainda mais dependente da relação comercial com a Argentina, o principal fornecedor. Entretanto, o Brasil está sujeito à constantes crises de abastecimento, devido às instabilidades econômicas daquele país, havendo sempre a necessidade de suprir a demanda interna recorrendo aos Estados Unidos e Canadá.

Somado a isto, há a alta do dólar – aumento de aproximadamente 54% entre janeiro de 2015 e janeiro de 2016 conforme boletim do Banco Central do Brasil (2016) – de modo que medidas que permitam o aproveitamento da matéria-prima nacional, mesmo que de menor qualidade, representam uma alternativa para evitar problemas emergenciais de fornecimento, evitando o aumento de custos com matéria-prima importada, reduzindo também, a dependência do Brasil pelo trigo do país vizinho.

Diante do exposto, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar o efeito de 9 enzimas comerciais sobre as propriedades reológicas de massas de farinha de trigo visando a substituição completa de aditivos químicos.

Os objetivos específicos foram:

- Identificar os efeitos de diferentes concentrações de cada enzima sobre os parâmetros reológicos das massas obtidas por uma farinha de trigo forte, padrão para panificação;
- Identificar a concentrações ótimas de cada enzima quando são utilizadas individualmente para melhoria destes parâmetros reológicos;
- Mapear seus efeitos de cooperação, ou antagônicos, quando usadas em combinação sobre os parâmetros reológicos das massas obtidas por uma farinha de trigo forte;

- Mapear seus efeitos de cooperação, ou antagônicos, quando usadas em combinação sobre os parâmetros reológicos das massas obtidas por uma farinha de trigo fraca, padrão para biscoitos;
- Identificar as enzimas que promovem efeitos benéficos na melhoria dos parâmetros reológicos das massas obtidas por ambas as farinhas, e a combinação ótima de cada uma delas;
- Verificar os efeitos da adição de um oxidante químico sobre as propriedades reológicas das massas obtidas por ambas as farinhas;
- Propor a melhor combinação enzimática para melhoria das propriedades reológicas das massas obtidas por ambas as farinhas, em substituição ao uso de oxidantes químicos;

CAPÍTULO II

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Farinha

A farinha, principal ingrediente para a elaboração de pães, sem outro qualificativo, é o produto obtido a partir da moagem do endosperma do grão de trigo (*Triticum* spp.) até obtenção de 70 a 80% de grão limpo (BRASIL, 2010). Sua funcionalidade tecnológica para produção de pães deve-se a presença de duas proteínas, gliadina e glutenina, que, quando hidratadas e submetidas a trabalho mecânico, formam o glúten; uma rede viscoelástica capaz de reter o gás formado durante a fermentação, proporcionando coesividade, extensibilidade e leveza à massa (EL-DASH, 1982). Quando submetido ao calor, o glúten coagula-se, através do vapor que expande em seu interior, tornando sua estrutura capaz de reter estes gases e dando aspecto esponjoso ao produto assado (ORNELLAS, 2001).

As proteínas do glúten podem ser divididas em gliadinas monoméricas e gluteninas poliméricas, com base na sua solubilidade. As gliadinas contribuem principalmente para a viscosidade e extensibilidade da massa, atuando como "agentes plastificantes", enquanto as gluteninas fornecem coesão e elasticidade criando uma estrutura de sustentação, semelhante a uma "espinha dorsal" (BELITZ et al., 2009). Durante a mistura, a rede de glúten é formada por reações de polimerização e despolimerização resultando na formação de uma estrutura de proteína polimérica capaz de unir os demais constituintes da massa e reter o gás formado durante a fermentação (BELTON e TAYLOR, 2002).

A qualidade proteica da farinha é susceptível a cultivar do trigo, às variações climáticas e processo de moagem, interferindo na fixação de um padrão de identidade e qualidade da farinha produzida, refletindo negativamente na fabricação do pão (ORNELLAS, 2001). No entanto, a legislação brasileira permite o uso de componentes auxiliares, conhecidos como aditivos ou melhoradores, para melhorar ou corrigir as características de qualidade de farinhas e massas (EDWARDS, 2007; CAUVAIN e YOUNG, 2009).

Normalmente esses aditivos atuam com a finalidade de equilibrar a atividade enzimática da farinha ou melhorar a força e tolerância da massa para o processo de panificação, especialmente naqueles que utilizam misturadoras de alta rotação (BORZANI et al., 2001). Os aditivos podem ser adicionados à farinha (no moinho) ou à massa (na panificadora), sendo que

os mais utilizados são os agentes oxidantes (ácido ascórbico, azodicarbonamida), emulsificantes (ésteres de ácido diacetil tartárico de mono e diglicerídeos, estearoil-2-lactil lactato de sódio e monoglicerídeo destilado), enzimas (amilases de cereais e fúngicas); ou composições contendo combinações entre os diferentes aditivos, também conhecidos como *blends* (CAUVAIN e YOUNG, 2007).

De acordo com a Instrução Normativa nº 38 de abril de 2010 (BRASIL, 2010), comercialmente as farinhas são classificadas como: Grupo I (alimentação humana) e Grupo II (moagem e outros usos), sendo que as farinhas pertencentes ao Grupo II são ainda distribuídas em classes: Melhorador, Pão, Doméstico, Básico e Outros Usos. Farinhas pertencentes às classes Melhorador e Pão, possuem características tecnológicas superiores sendo destinadas a panificação, enquanto farinhas pertencentes às classes Doméstico e Básico possuem características tecnológicas inferiores sendo destinadas à produção de biscoitos e confeitaria, cujos valores serão discutidos a seguir.

2.2. Características físico-químicas da farinha de trigo

2.2.1. Umidade

De acordo com a Instrução Normativa nº 8 (BRASIL, 2010), farinhas de trigo devem ter uma umidade máxima de 13%, garantindo a estabilidade das demais características químicas e microbiológicas da farinha durante a armazenagem.

2.2.2. Cinzas

O teor de cinzas informa a quantidade de matéria mineral (%) presente na farinha. Os minerais presentes no grão de trigo concentram-se principalmente na casca e, por consequência, farinhas com maior grau de extração, terão também maior percentual de matéria mineral (PIZZINATTO et al., 2004).

O teor de matéria mineral na farinha também é indicativo de sua qualidade tecnológica. É o principal parâmetro de identidade dos tipos de farinha produzidos comercialmente no Brasil. De acordo com a Instrução Normativa nº 8 (BRASIL, 2010), farinhas do Tipo I (indicadas para panificação) devem ter um máximo 0,8% de cinzas enquanto que farinhas do tipo II (indicadas para confeitaria) devem ter um máximo de 1,4% de cinzas.

Farinhas com alto teor de cinzas indicam também a presença de alta concentração de material de parede celular, como celulose e hemicelulose, que tem um impacto negativo sobre

as propriedades reológicas das massas, devido à interferência na formação adequada da rede de glúten (PRIMO-MARTÍN e MARTÍNEZ-ANAYA, 2003)

2.2.3. Cor

A cor das farinhas, bem como o teor de cinzas, está relacionada ao percentual de matéria mineral, proveniente da casca. Farinhas com alto grau de extração possuem maior quantidade de pigmentos escuros que irão interferir na sua coloração. Por outro lado, a cor pode estar relacionada à variedade e condições de cultivo do trigo, cuja concentração de pigmentos carotenoides no endosperma do grão, pode levar a uma coloração mais amarelada da farinha (PIZZINATTO et al., 2004).

Sendo que:

- *Luminosidade L**: possui escala de zero (preto) a 100 (branco), ou seja, quanto mais próximo de 100, mais branca é a farinha.
- *Coordenada de cromaticidade a**: varia de a* positivo (tendência de cor para tonalidade vermelha) até a* negativo (tendência da cor para tonalidade verde). Ou seja, quanto menor o valor de a* tendendo a zero, mais branca é a farinha.
- *Coordenada de cromaticidade b**: varia de b* positivo (tendência da cor para tonalidade amarela) até b* negativo (tendência da cor para tonalidade azul). Ou seja, quanto maior o valor de b*, tendendo a zero, mais branca é a farinha.

2.2.4. Índice de glúten

Todos os grãos contém proteínas, mas somente o trigo possui as proteínas nas quantidades e qualidades necessárias para a formação do glúten (DOBRASZCZYK e MORGENSTERN, 2003). Portanto, a capacidade das massas provenientes de cada farinha de formar uma rede viscoelástica de qualidade é depende da quantidade e qualidade inicial das proteínas gliadinas e gluteninas (insolúveis em água), medidas pelo método de lavagem, onde somente as proteínas formadoras de glúten são mensuradas, baseado na sua insolubilidade (STEAR, 1990).

Farinhas para panificação devem conter um mínimo de 9,0 % de glúten seco, enquanto farinhas destinadas à produção de biscoitos devem possuir valores inferiores.

Tão importante quanto a quantidade, é a qualidade deste glúten, estimada pela medida do Índice de glúten, que é a relação entre o glúten seco e a quantidade total de glúten, expressa

em percentual. Quanto mais próximo a 100 %, melhor é a qualidade do glúten de cada farinha. Ou seja, mesmo farinhas com alta quantidade de glúten, podem ser tecnologicamente inferiores, devido à baixa qualidade destas proteínas, que estão relacionadas a qualidade da rede viscoelástica formada durante o processo de panificação (STEAR, 1990; CAUVAIN e YOUNG, 2007).

2.3. Características reológicas da massa de farinha de trigo

A expressão "força de uma farinha" normalmente é utilizada para designar a qualidade tecnológica de farinhas de trigo e seu potencial para panificação, associando sua maior ou menor capacidade de sofrer um tratamento mecânico ao ser misturada com água e também sua capacidade de absorção de água pelas proteínas formadoras de glúten e retenção do gás carbônico gerado durante a fermentação (PIZZINATTO et al., 2004).

Estas características podem ser mensuradas através de testes reológicos e seu conhecimento permite a avaliação da eficiência de moagem e da qualidade da matéria-prima, a previsão do comportamento da farinha durante processamento, além da escolha da farinha mais adequada para cada produto.

2.3.1. Falling Number

A enzima de maior importância tecnológica para a farinha de trigo é a α -amilase. Ela atua principalmente sobre o amido gelatinizado durante aquecimento em presença de água. A gelatinização do amido é que determina a consistência das massas resultantes de cada farinha, e sua taxa de retrogradação nos produtos de panificação é que determina a vida de prateleira destes (CAUVAIN e YOUNG, 2007; HUI e ZHOU, 2014).

A degradação do amido danificado (moagem) e gelatinizado, pela enzima α -amilase é essencial para panificação, seja para a liberação de dextrinas fermentescíveis para a levedura durante a fermentação; seja para a liberação de açúcares redutores, que irão conferir *flavor* e coloração características dos produtos panificados durante o forneamento (EDWARDS, 2007).

A medida da atividade de α -amilase na farinha, também conhecida como atividade diastásica, é geralmente avaliada pelo método de Hagberg Falling Number - ou Número de Queda. O método baseia-se na capacidade de redução da viscosidade de uma suspensão de farinha, ao longo do tempo, pela degradação do amido gelatinizado, até a inativação da enzima. A medida da atividade enzimática (FN) é expressa em segundos (s), através da medida da estimativa da sua capacidade de degradação do amido (LINKO et al., 1997; CAUVAIN e

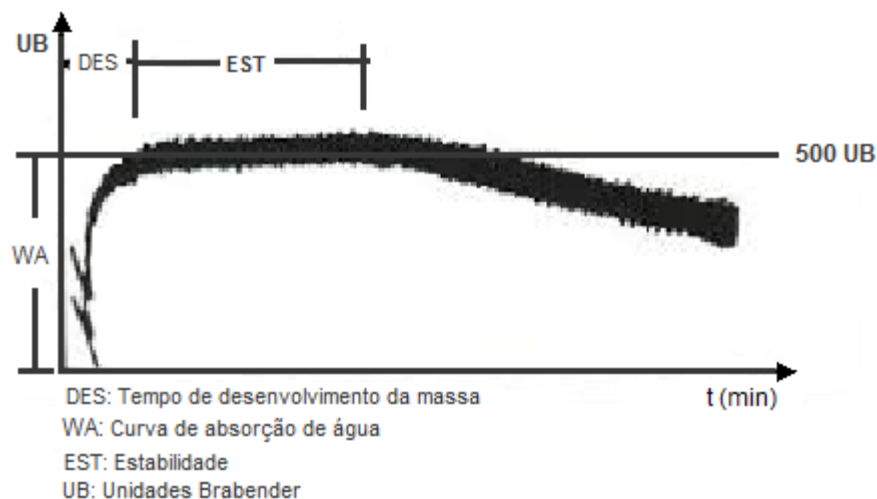
YOUNG, 2007; HUI e ZHOU, 2014). Ou seja, é a medida do efeito e não da quantidade real de enzima presente na farinha.

Farinhas para panificação devem possuir uma atividade de α -amilase na faixa de 250 a 320 s. Uma alta atividade de α -amilase (< 250 s), irá promover a degradação excessiva do amido resultando em produtos densos, de baixo volume, com miolo pegajoso e casca de coloração muito escura. Uma baixa atividade de α -amilase (> 320 s), irá promover uma degradação insuficiente do amido, resultando em produtos compactos, de baixo volume, com miolo seco e quebradiço e coloração opaca (PIZZINATTO et al., 2004).

2.3.2. Farinografia

Executada em equipamento denominado Farinógrafo Brabender, a análise de farinografia basicamente mede a resistência oferecida por uma massa ao longo do tempo durante uma mistura a velocidade e temperaturas constantes (EDWARDS, 2007). A curva resultante - Resistência (UB –Unidades Brabender) x tempo (min) - é chamada de farinograma (Figura 1) e informa as propriedades de formação, desenvolvimento e estabilidade das massas resultantes de acordo com cada perfil de farinha.

Figura 1: Farinograma típico obtido por análise em Farinógrafo Brabender.



Fonte: O Autor (2016)

Os parâmetros avaliados são:

- **Absorção de água (WA):** Expressa em percentual, tomando como base uma amostra de farinha com 14% de umidade. É a capacidade de absorção de água pela farinha, para

obtenção da consistência requerida. Farinhas para panificação possuem geralmente uma WA em torno de 56 – 57% (PIZZINATTO et al., 2004).

Valores superiores podem estar relacionados a farinhas excessivamente fortes, com alto conteúdo de glúten e amido não danificado pela moagem, quando o teor de cinzas for baixo. Da mesma forma, farinhas fracas podem aumentar a WA, devido ao alto conteúdo de pentosanas provenientes de seu maior grau de extração, evidenciado por um teor de cinzas elevado (PIZZINATTO et al., 2004; CAUVAIN e YOUNG, 2007).

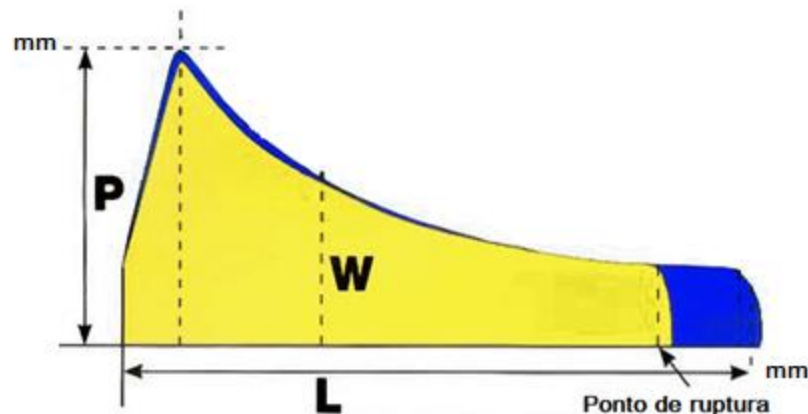
- **Desenvolvimento:** Expresso em minutos, indica o tempo de mistura necessário para se atingir a consistência de massa ideal. Farinhas para panificação atingem seu desenvolvimento ideal em aproximadamente 4 – 10 min, enquanto que farinhas fracas geralmente atingem esse ponto em até 4 minutos (PIZZINATTO et al., 2004).
- **Estabilidade:** Expressa em minutos, fornece a medida de tolerância da massa à mistura, indica a força da farinha e também sua estabilidade à fermentação durante o processo de panificação. Corresponde ao intervalo de tempo entre a chegada e a saída do gráfico da linha de 500 UB.

Farinhas para panificação possuem uma elevada estabilidade à mistura (> 15 min) enquanto que farinhas fracas possuem baixa estabilidade (< 15 min) (PIZZINATTO et al., 2004).

2.3.3. Alveografia

O teste realizado em equipamento denominado alveógrafo Chopin, é utilizado para avaliar as características viscoelásticas das massas produzidas com as amostras de farinha e simular seu comportamento durante o processo de fermentação (EDWARDS, 2007). O princípio do teste é o insuflamento de ar, à pressão constante, em um pequeno disco de massa que irá se deformar até sua ruptura, expressando graficamente as características viscoelásticas das massas formadas. Ao contrário de outros métodos comumente usados, o método alveográfico sujeita a massa à uma extensão biaxial, ao longo de um paralelo e ao longo de um meridiano da bolha de massa insuflada, o que se assemelha à deformação que ocorre na massa durante a fermentação e forneamento (PIZZINATTO et al., 2004). O teste de alveografia gera uma curva, chamada de alveograma (Figura 2), em que os seguintes parâmetros são avaliados:

Figura 2: Alveograma típico obtido por análise em Alveógrafo Chopin

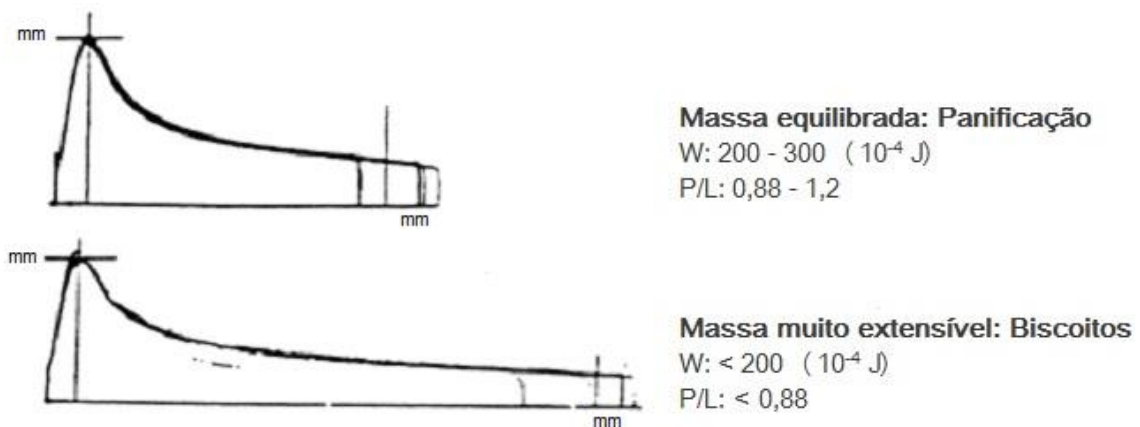


Fonte: (PIZZINATTO et al., 2004) com adaptações do autor (2016)

- **W:** Expresso como 10^{-4} J, representa o trabalho de deformação da massa, correspondente à medida da área abaixo da curva do gráfico. Está relacionado com a qualidade do glúten e da farinha, onde um alto valor de W (200 – 300), indica uma farinha forte e indicada para panificação. Já farinhas fracas, indicadas para a produção de biscoitos e confeitaria, possuem baixos valores de W (< 200) (PIZZINATTO et al., 2004).
- **P:** Expresso em mm, representa a tenacidade da massa, correspondente à medida da altura máxima da curva do gráfico (eixo das ordenadas). Indica a pressão máxima de ruptura da massa, e está relacionada com sua elasticidade e capacidade de absorção de água. Farinhas fortes possuem valores de P em torno de 80 – 100 mm, enquanto que farinhas fracas possuem valores inferiores a 80 mm (PIZZINATTO et al., 2004).
- **L:** Expresso em mm, representa a extensibilidade da massa, correspondente à medida do comprimento da curva do gráfico (eixo das abscissas). Indica a capacidade de extensão da massa, e está relacionada ao rendimento da farinha e volume final dos pães. Farinhas fortes possuem valores de L em torno de 60 – 70 mm, enquanto que farinhas fracas possuem valores superiores a 70 mm (PIZZINATTO et al., 2004).
- **Proporção P/L:** Representa o equilíbrio da massa, correspondente à razão (P) por (L). Indica o equilíbrio reológico da farinha, e está relacionado com sua qualidade panificável. Farinhas equilibradas possuem proporcionalidade entre 0,88 – 1,2, sendo recomendadas para panificação (EDWARDS, 2007). De acordo com PIZZINATTO et al. (2004), valores altos de P/L (> 1,2) indicam que a farinha gerará massas de caráter

mais elástico do que extensível, o que irá afetar negativamente os pães produzidos, que serão compactos, de baixo volume e de textura mais firme. Já farinhas com valores baixos de P/L ($< 0,88$), indicam que a farinha gerará massas de caráter mais extensível do que elástico (Figura 3). Isto também afetará negativamente os pães produzidos, que serão compactos, de baixo volume e com miolo pegajoso.

Figura 3: Alveograma típico de uma farinha forte (panificação) e uma farinha fraca (biscoitos).



Fonte: O Autor (2016)

2.4. Aditivos químicos utilizados em farinhas de trigo

2.4.1. Azodicarbonamida (ADA)

A Azodicarbonamida (ADA), inicialmente era utilizada como agente de expansão na produção de espuma de polietileno, produtos à base de borracha e produtos de PVC (policloreto de vinila) rígido e flexível (SAMPAIO, 2004). Em alguns países, como Brasil e Estados Unidos, é permitido seu uso como um aditivo alimentar, principalmente como agente branqueador de farinha e como melhorador em massas de pães, por ser um agente oxidante de ação rápida, com efeito semelhante ao ácido ascórbico, através da oxidação dos grupamento S-H das gluteninas para a formação de grupos S-S, que conferem mais resistência e elasticidade ao glúten. O efeito geral é produzir uma rede de glúten estável, mais forte e elástica, capaz de se expandir sem ruptura durante a fermentação e assamento. Geralmente é utilizada até um máximo de 40 mg/kg de farinha (BECALSKI et al., 2006; YE et al., 2011; ALMEIDA e CHANG, 2012).

Em outubro de 2003, a Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (EFSA) divulgou dois relatórios implicando selos de PVC expandido fabricados com ADA, como sendo a fonte

da semicarbazida encontrada numa variedade de *jarred foods* (alimentos embalados em frascos de vidro com tampa de metal) lacrados com selo de PVC (STADLER et al., 2004; YE et al., 2011).

A semicarbazida (SEM) é um produto da degradação de ADA e também um indicador estabelecido para determinar o uso ilegal do composto antimicrobiano nitrofurazona (semicarbazona 5-nitro-2-furaldeído) em produtos de origem animal. Em meio seco ADA é estável, mas em contato com a água e sob aquecimento, reage formando o composto biurea. Esta, com a elevação da temperatura, decompõe-se em semicarbazida (e outros metabólitos de menor interesse) que apresenta alta carcinogenicidade, teratogenicidade e mutagenicidade (STAUFFER, 1990; STADLER et al., 2004; BECALSKI et al., 2006).

Estudos de conteúdo de SEM em diferentes alimentos de diferentes países, relataram níveis detectáveis de semicarbazida em uma variedade de pães disponíveis no mercado, atribuindo o uso de azodicarbonamida para tratamento de farinha, como a fonte de geração. Em alguns países como Austrália, Europa e Cingapura, a azodicarbonamida é proibida, sendo que neste último, sua utilização em alimentos pode resultar em até 15 anos de prisão e uma multa de US\$ 450 000 (NOONAN et al., 2008; YE et al., 2011).

Como medida de segurança à saúde do consumidor e também como forma de assegurar meios de produção de alimentos mais limpos e com menor adição de compostos químicos, a substituição de ADA por alternativas naturais, à exemplo das enzimas, torna-se necessária.

2.5. Enzimas

Enzimas são proteínas com alta atividade catalítica e sintetizadas por células biológicas em todos os organismos. São catalisadores biológicos altamente específicos de diversas reações químicas e metabólicas e largamente utilizadas na indústria de alimentos (BELITZ et al., 2009). O setor de panificação, especialmente, tem se beneficiado de sua aplicação, principalmente, com a finalidade de minimizar as deficiências inerentes a matéria-prima a fim de corrigir, melhorar e padronizar as características reológicas das farinhas de trigo e, também, para a elaboração de produtos de panificação de qualidade, diferenciados e de maior vida útil (POUTANEN, 1997).

As enzimas apresentam muitas funções na produção de pães, podendo atuar nas moléculas de amido ou de proteínas e também atuar como branqueadores de farinhas com alto teor de pigmentos escuros, dependendo de sua especificidade. As mais utilizadas são as

α -amilases, xilanases, oxirredutases, lipases, proteases, lipoxigenase e mais recentemente transglutaminase e lacase (MINUSSI et al., 2002; CAUVAIN e YOUNG, 2007).

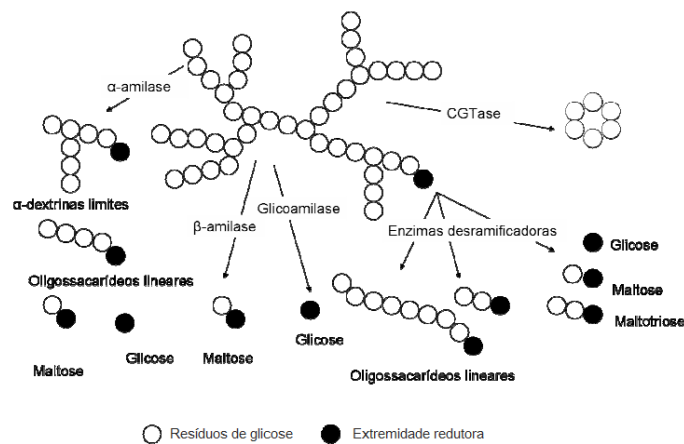
2.5.1. α -Amilases

O amido é o mais importante polissacarídeo de reserva dos cereais, composto por resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo α -(1,4), principalmente, e α -(1,6), ocasionalmente (NELSON et al., 2006). No grão de trigo, representa cerca de 60% de sua constituição, concentrando-se no endosperma, fração que dará origem a farinha panificável (QUAGLIA, 1991; YÚFERA, 1998; CAUVAIN e YOUNG, 2007).

O amido é composto por amilose, polímero de cadeia linear composto aproximadamente por 500 - 2.000 unidades de D-glicose, unidas por ligações α -(1,4) e com uma extremidade redutora; e amilopectina, polímero de cadeia altamente ramificada de pequenas cadeias lineares de D-glicose, unidas entre si por ligações do tipo α -(1,6), formando uma espécie de ramificação na cadeia de amilose (BULÉON et al., 1998; NELSON et al., 2006). Todos os amidos são constituídos de uma ou de ambas moléculas, cuja proporção varia de acordo com sua fonte.

Enzimas amilolíticas são um conjunto de enzimas que catalisam a hidrólise ou síntese das ligações glicosídicas do amido. São divididas em endoamilases, exoamilases, enzimas desramificadoras e transferases (Figura 4). Atuam nas ligações α -(1,4) e/ou (α -1,6) dos polímeros amiláceos gerando mono, di e trissacarídeos, oligossacarídeos e α -dextrinas limite (carboidratos ramificados de baixo peso molecular) de acordo com sua especificidade (MURALIKRISHNA e NIRMALA, 2005).

Figura 4: Representação esquemática das enzimas degradadoras de amido.



Fonte: PY-DANIEL (2010)

As amilases são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas do amido, pertencendo à classe das hidrolases. São classificadas como endoamilases ou exoamilases, de acordo com seu ponto de atuação e produtos de hidrólise do amido (WONG, 1995).

As endoamilases são responsáveis pela hidrólise das ligações glicosídicas α -(1,4) internas das cadeias de amilose e amilopectina, resultando em oligossacarídeos de tamanhos variados e diferentes, cuja principal enzima de interesse na correção de farinhas é a α -amilase (VAN DER MAAREL et al., 2002).

Já as exoamilases agem sobre os resíduos externos de glicose da cadeia de amilose e amilopectina, liberando glicose, maltose e β -dextrinas limite. As exoamilases podem atuar somente nos resíduos de glicose α -(1,4), como também em ambas ligações α -(1,4) e α -(1,6), dependendo da disponibilidade de substrato (VAN DER MAAREL et al., 2002; LEMAN et al., 2005), liberando principalmente maltose ou outros maltooligossacarídeos, como maltotetraose ou maltohexose (GOESAERT et al., 2005). Um típico exemplo, são as β -amilases, responsáveis pela hidrólise das ligações α -(1,4) das extremidades não redutoras da molécula de amido, cuja ação é bloqueada nos pontos de ramificação α -(1,6) (GOESAERT et al., 2009).

A atividade diastásica da farinha, medida através do teste de Falling Number, é a soma das atividades de endo (α -amilase) e exoamilases (β -amilase), e que determinará a capacidade de conversão do amido em açúcares fermentescíveis para as leveduras atuarem durante a fermentação. Cada vez que uma molécula de amido é hidrolisada pela α -amilase, dois locais são criados para que a β -amilase possa atuar (CAUVAIN e YOUNG, 2007). Portanto, é o nível de α -amilase que determinará a velocidade no sistema.

A maioria das farinhas de trigo contêm um nível adequado de β -amilase, mas geralmente um baixo nível de α -amilases naturais, tornando-se necessária a adição de α -amilases exógenas. O efeito da adição de α -amilase à farinha é dependente de, pelo menos, três fatores: concentração adicionada, a temperatura de processamento e o micro-organismo produtor.

As α -amilases podem ser encontradas nos mais variados organismos, cuja origem, definirá sua eficiência, especificidade, produtos de hidrólise e estabilidade térmica.

2.5.1.1. α -Amilase fúngica

É uma endoamilase pertencente à família das glicosil hidrolases (GH 13) e produzida, principalmente, pelo fungo *Aspergillus oryzae*. Possui pH ótimo 4,8 - 5,8 (estável até pH 8,5), temperatura ótima em torno de 45 - 55°C e temperatura de inativação a partir de 60 °C (GUPTA et al., 2003). Devido a sua baixa estabilidade térmica, tem sido muito utilizada na correção e

padronização de farinhas, pois em caso de dosagens excessivas, ela será rapidamente inativada, sem causar danos aos produtos finais (CAUVAIN e YOUNG, 2007).

2.5.1.2. α -Amilase bacteriana

Endoamilase também pertencente à das glicosil hidrolases (GH 13), produzida pelo micro-organismo *Bacillus subtilis*. Possui pH ótimo entre 5,0 - 7,0 (estável até pH 8,5), temperatura ótima em torno de 60 – 70 °C e temperatura de inativação a partir de 90 °C (GUPTA et al., 2003). Embora mais eficiente do que a α -amilase de origem fúngica, a α -amilase bacteriana é menos utilizada em farinhas para panificação, principalmente devido a sua alta estabilidade térmica que, mesmo durante o processo de cozimento, ainda mantém alguma atividade e continua liberando dextrinas (CAUVAIN e YOUNG, 2007).

2.5.1.3. α -Amilase maltogênica

Embora seja uma endoamilase pertencente à família GH 13, a α -amilase maltogênica possui também uma atuação característica das exoamilases (GOESAERT et al., 2009). Produzida por *Bacillus stearothermophilus*, possui pH ótimo entre 4,0 - 5,8 (estável até pH 9,1), temperatura ótima em torno de 50 – 65 °C e temperatura de inativação a partir de 70 °C (VAN DER MAAREL et al., 2002).

Seu modo de atuação ainda não é claro e tem sido amplamente debatido. No entanto, a hipótese mais aceita é de que possui um modo de ação de múltiplo ataque à cadeia da amilose, onde, nos primeiros estágios de hidrólise, ela age como uma exoamilase, hidrolisando os resíduos externos de glicose e, com o aumento do tempo de incubação, sob temperaturas elevadas, ela age preferencialmente como uma endoamilase, hidrolisando as ligações internas da cadeia (LEMAN et al., 2005; GOESAERT et al., 2009).

Enquanto as α -amilases de origem fúngica e bacteriana são amplamente utilizadas para correção de atividade diastásica (FN) da farinha, α -amilase maltogênica é utilizada principalmente para prolongar o frescor e a vida de prateleira dos produtos de panificação, devido ao seu efeito de redução do fenômeno de retrogradação do amido (QUEJI et al., 2009; BECKER et al., 2012). Por atuar principalmente como uma exoamilase, atacando as cadeias externas da amilopectina, ocorre uma inibição da formação da área de junção cristalina, limitando a recristalização da amilopectina, e conseqüentemente, imobilizando a água no interior do grânulo de amido (VAN DER MAAREL et al., 2002). Com isto, há a preservação

das características de textura (maciez) dos produtos de panificação durante um período maior de armazenagem.

De um modo geral, independente da fonte de α -amilases, é primordial para a correção de farinhas conhecer os efeitos desta enzima nos parâmetros reológicos das massas resultantes. Uma vez que concentrações elevadas promovem formação excessiva de dextrinas, afetam diretamente a consistência da massa, provocando mudanças na sua capacidade de absorção de água, extensibilidade e capacidade de retenção de gás. Estas mudanças irão refletir posteriormente nas características de qualidade dos pães, como volume dos pães, a textura e conformação de miolo e coloração da casca (QUEJI et al., 2009; BECKER et al., 2012).

2.5.2. Xilanases

Também conhecidas como hemicelulases, as xilanases são enzimas que atuam de forma controlada rompendo as frações de pentosanas na farinha de trigo. As pentosanas são o material formador da parede celular vegetal e são constituídas por uma mistura complexa de moléculas de cadeia longa, formada principalmente por arabinoxilanas. Na farinha de trigo, as pentosanas representam cerca de 2 % do peso total da farinha. Sua presença interfere na formação da rede de glúten e, quando em excesso, prejudicam a força da massa e o volume final do pão (Cauvain, 2007).

Arabinoxilanas (AX) são polissacarídeos não-amiláceos do material da parede celular de grãos e cereais, que consiste de uma cadeia principal de unidades de xilose substituídas com resíduos de arabinose (MOERS et al., 2005), que estão associadas às proteínas da farinha de trigo, afetando a correta formação da rede de glúten por impedimento estérico (COURTIN e DELCOUR, 2002).

As AX de trigo são classificadas como extraíveis em água (WE-AX) e não-extraíveis em água (WU-AX). WU-AX são prejudiciais para a produção de pão, enquanto WE-AX de médio e alto peso molecular tem um impacto positivo no volume de pão (COURTIN e DELCOUR, 2001). A propriedade mais importante de WE-AX é o seu potencial de ligação de água, sendo que 1 g pode ligar-se a 15 g de água (AHMAD et al., 2013).

As xilanases (endo 1,4 β D-xilano hidrolase) são endo-enzimas que hidrolisam a cadeia principal de AX (BATAILLON et al., 2000), liberando arabinoxilanas solúveis em água com menor peso molecular (PRIMO-MARTÍN et al., 2005), promovendo uma melhoria na reologia das massas provenientes de cada farinha, aumentando sua extensibilidade e maleabilidade, bem como alterações na capacidade de absorção de água (AHMAD et al., 2013).

As xilanases são produzidas por uma multiplicidade de organismos, cuja origem, definirá sua especificidade, produtos de hidrólise e também estabilidade térmica.

2.5.2.1. Xilanase fúngica

É uma endoxilanase pertencente à família das glicosil hidrolases (GH 10), com peso molecular de aproximadamente 30 kDa e produzida, principalmente, por fungos da espécie *Aspergillus* sp. Possui pH ótimo entre 3,5 - 5,0 (ativas em pH 3,0 – 10,0), temperatura ótima em torno de 40 – 60 °C e preferência de substrato para WE-AX (BIELY et al., 1997; COURTIN e DELCOUR, 2001; 2002; MOERS et al., 2005).

Devido a sua alta estabilidade ao pH e atividade ótima em condições ácidas, tem sido muito utilizada em sistemas fermentativos, como na panificação, em relação às xilanases bacterianas, pouco tolerantes a redução do pH.

2.5.2.2. Xilanase bacteriana

É uma endoxilanase pertencente à família das glicosil hidrolases (GH 11) com peso molecular de aproximadamente 20 kDa e produzida, principalmente, por bactérias do gênero *Bacillus* sp. Possui pH ótimo entre 6,0 – 7,0 (ativas em pH 5,0 – 7,3), temperatura ótima em torno de 40 – 60 °C e preferência de substrato para WU-AX (BIELY et al., 1997; COURTIN e DELCOUR, 2001; 2002; MOERS et al., 2005).

Independente da fonte, de uma maneira geral, os principais benefícios promovidos pelo uso das xilanases em panificação é a melhora na maquinabilidade e extensibilidade das massas promovidos pela hidrólise das WU-AX e liberação de água na massa (COURTIN e DELCOUR, 2002; SELINHEIMO et al., 2006). Com isso, há também um aumento no volume do pão; formação de uma estrutura alveolar de miolo mais fina e uniforme; melhora na textura e forma dos pães; além de melhora na coloração de crosta e flavor ocasionados pela presença dos açúcares liberados pela hidrólise das AX (COLLINS et al., 2006; CAUVAIN e YOUNG, 2007).

2.5.3. Oxirredutases

2.5.3.1. Glicose oxidase

A glicose oxidase (GOX), β -D-glicose:oxigênio 1-oxidoreductase, pertence à categoria das oxidases e catalisa a oxidação de β -D-glicose para ácido glicônico, pela utilização do

oxigênio molecular como um aceptor de elétron, com produção simultânea de H_2O_2 (BANKAR et al., 2009). O H_2O_2 oxida os grupos tiol das proteínas de glúten para formar ligações dissulfeto (PRIMO-MARTÍN et al., 2005). Esta reação favorece a oxidação das proteínas aumentando a tenacidade do glúten e reduzindo sua extensibilidade. Seu efeito é semelhante ao do ácido ascórbico: fortalece a massa, melhorando a retenção de gás e o volume dos pães (GOESAERT et al., 2007).

Em farinhas de trigo, também está relacionada ao processo de gelificação oxidativa de arabinoxilanas, por dimerização de seus ésteres ferúlicos, exercendo um efeito oxidante na massa e promovendo a melhora da rede de glúten (FIGUEROA-ESPINOZA e ROUAU, 1998; LABAT et al., 2001; SELINHEIMO et al., 2006). Bonet et al. (2006) observaram que massas adicionadas de GOX apresentaram aumento da tenacidade (P) e redução da extensibilidade (L) em baixas concentrações. Este aumento de tenacidade produziu massas mais fortes e elásticas e menos extensíveis, atribuídos à formação de pontes dissulfetos, o que também gerou um aumento de volume e a melhora na estrutura do miolo.

2.5.3.2. Lacase

A lacase (LAC) - benzenodiol: oxigênio oxidorreduase - assim como a glicose oxidase, é uma enzima oxidativa. Na farinha de trigo, catalisa reações de polimerização de arabinoxilanas com resíduos de ácido ferúlico esterificado, formando uma forte rede de arabinoxilanas. Também atua promovendo ligações cruzadas entre algumas proteínas, o que resulta na oxidação de grupamentos sulfidrilas. Desta forma, são formadas pontes dissulfetos, que conferem mais resistência e elasticidade ao glúten (FIGUEROA-ESPINOZA e ROUAU, 1998; MINUSSI et al., 2002; MATTINEN et al., 2006; SELINHEIMO et al., 2006).

2.5.4. Lipase

Lipase (LIP), triacilglicerol hidrolase, é uma enzima lipolítica, pertencente a classe das hidrolases. Melhoram a reologia de massas, pela hidrólise dos lipídeos da farinha de trigo, liberando ácidos graxos, principalmente mono e di glicerídeos, que tem melhores propriedades emulsificantes (GERITS et al., 2014). Este efeito emulsificante se dá pela interação entre estes lipídeos, o oxigênio dissolvido na massa, água e as proteínas do glúten, distribuindo-os uniformemente e estabilizando a rede de glúten (GERITS et al., 2014). Com isto, há uma melhora nas propriedades de maquinabilidade das massas, reduzindo o tempo de desenvolvimento e melhorando sua tolerância à mistura e expansão (STAMPFLI et al., 1996).

As lipases também têm se mostrado eficazes na melhoria da qualidade do pão, por seu efeito no retardo de seu endurecimento. Promovem uma “impermeabilização” dos grânulos do amido, evitando a perda de água e reduzindo o efeito de retrogradação do amido, durante o armazenamento (BELITZ et al., 2009).

2.5.5. Transglutaminase

A transglutaminase (TG), proteína-glutamina- γ -glutamil transferase, ocorre naturalmente em diversos organismos, principalmente *Streptoverticilium* spp. e fazem parte do grupo das transferases. Catalisam reações de desamidação e transferência de grupamentos acil, mas sua reação mais importante é a ligação de proteínas por uma ligação isopeptídica. Este tipo de ligação tem a capacidade de aumentar o tamanho das proteínas resultantes e criar uma ampla rede dentro da matriz alimentar. (GERRARD et al., 1998; KURASHI et al., 2001). Em produtos de panificação, a adição de TG à massa melhora a força do glúten, aumentando sua estabilidade, viscoelasticidade e, conseqüentemente, aumentando o volume, melhorando a estrutura e crosta do produto final (STEFFOLANI et al., 2010).

A transglutaminase catalisa a formação de ligações intra ou intermolecular entre γ -carboxamida de resíduos de glutamina e grupos ϵ -amino de resíduos de lisina pela reticulação de subunidades de gluteninas, principalmente de peso molecular elevado, modificando a estrutura da proteína e aumentando o número de ligações dissulfeto (DE SOUZA et al., 2008; STEFFOLANI et al., 2010). Com isso, há um efeito de fortalecimento na massa pela promoção de ligações cruzadas entre as proteínas, melhorando a rede de glúten (COLLAR e BOLLAIN, 2005).

2.6. Combinações enzimáticas

Enzimas hidrolíticas como amilases e xilanases têm sido largamente estudadas. Porém, estudos sobre seu uso combinado com enzimas de fortalecimento da massa ainda são limitados. O uso combinado de enzimas para produção de pães é de extrema importância, uma vez que estas agem em diferentes frações da farinha de acordo com seu mecanismo de ação particular, afetando de diversas maneiras as propriedades funcionais da massa de pão.

CABALLERO et al. (2007) observaram que o uso de protease combinada com transglutaminase ou glicose oxidase apresentou um efeito sinérgico significativo na relação altura/largura e volume específico de pães de fôrma. Este resultado denota que o efeito hidrolítico da protease, provavelmente contrabalançando a polimerização excessiva da proteína

catalisada pela transglutaminase, ou a oxidação excessiva promovida pela glicose oxidase, possibilitou um melhor desenvolvimento da massa durante a fermentação e forneamento.

Diversos estudos têm correlacionado benefícios na reologia de massas pela adição de xilanases em combinação com oxirredutases. AX da farinha de trigo têm a propriedade única de formação de gel e ligações cruzadas sob condições oxidantes. Este mecanismo de reação ainda tem sido amplamente debatido, mas a teoria mais aceita é de que em presença de enzimas como glicose oxidase e lacase, ocorre o entrecruzamento das ligações de AX, formando o acoplamento de dois resíduos de ácido ferúlico através de uma ligação covalente. O sistema inicia o processo oxidativo através da formação de um radical fenoxi reativo, que pode formar um dímero ou reagir com um outro radical. Desta forma, vários dímeros de ácido ferúlico são formados. Em resumo, a fração fenólica das AX, atua como um sítio de iniciação, em vez de um centro de ligação cruzada. O principal resultado é um forte aumento na viscosidade da solução, onde um gel é formado (COURTIN e DELCOUR, 2001; FIGUEROA-ESPINOZA et al., 2004; PRIMO-MARTÍN et al., 2005; SELINHEIMO et al., 2006; FLANDER et al., 2008).

INDRANI et al. (2003) observaram que a combinação de glicose oxidase e xilanase, preveniram o relaxamento excessivo de massas adicionadas de α -amilase fúngica e protease e, a atuação destas promoveu a melhora das propriedades reológicas das massas avaliadas, bem como afetou positivamente o volume e a estrutura do miolo.

CABALLERO et al. (2007), observaram que os efeitos combinados de TG+GOX e TG+PROT (protease) promoveram efeitos sinérgicos benéficos sobre os parâmetros alveográficos. Amilase (AMI) e pentosanase (PEN) somente melhoraram os parâmetros reológicos quando combinadas com as demais enzimas. Os dados de panificação revelaram interações significativas entre TG e todas as outras enzimas, exceto com lacase (LAC). Foi observado efeito sinérgico significativo na qualidade dos pães pelo uso combinado de GOX+LAC; GOX+PEN; AMI+LAC; AMI+PROT e PEN+PROT.

CAPÍTULO III

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Enzimas

As enzimas utilizadas foram gentilmente cedidas pelos fornecedores a seguir citados, sob a condição de serem puras, isto é, sem estar adicionada ou complexada com outra enzima, para não mascarar seus verdadeiros efeitos. Suas atividades foram determinadas e expressas em unidade de atividade enzimática por grama de preparado comercial (U.g^{-1}), sem purificação prévia, a fim de permitir a comparação entre as enzimas de forma equivalente.

Foram estudadas as seguintes enzimas comerciais seguidas de suas respectivas atividades mensuradas: α -amilase fúngica de *Aspergillus oryzae* Veron M4 (AB Enzymes, 2400 U.g^{-1}); α -amilase bacteriana de *Bacillus amyloliquefaciens* Spring Alfa Bac 7500 (Granolab, 1800 U.g^{-1}); α -amilase maltogênica de *Bacillus stearoothermophilus* Veron Mac (AB Enzymes, 2079 U.g^{-1}); xilanase fúngica de *Aspergillus niger* Veron 191 S (AB Enzymes, 2194 U.g^{-1}); xilanase bacteriana de *Bacillus subtilis* Veron RL (AB Enzymes, 2077 U.g^{-1}); glicose oxidase fúngica de *Aspergillus niger* Spring Gluz (Granolab, 2376 U.g^{-1}); lipase bacteriana de *Humicola* spp. Enzymill FL (Vallens Food Ingredients, 5700 U.g^{-1}); transglutaminase bacteriana de *Streptoverticillium mobarense* Veron TG (AB Enzymes, 1400 U.g^{-1}) e lacase fúngica de *Aspergillus oryzae* (Granolab, 260 U.g^{-1}).

3.1.2. Farinha

As amostras de farinhas utilizadas foram gentilmente fornecidas pelo Moinho Tondo S.A. (Forqueta, RS), sem branqueamento, ou qualquer tipo de aditivação química ou enzimática. As amostras foram armazenadas ($25 \text{ }^\circ\text{C}$, umidade relativa 70%) durante 90 dias, antes de seu uso, para estabilização do processo natural de maturação. O valor de Falling Number e os parâmetros farinográficos e alveográficos foram acompanhados até valor constante, como ponto final de estabilização.

Dois tipos de farinha de trigo foram utilizados neste trabalho (Tabela 1). A “Farinha A” é uma farinha sem aditivação, proveniente de mescla de trigos Nacional (50%), Americano

(10%) e Argentino (40%), com 70% de extração, classificada de acordo com a regulamentação brasileira como Grupo II – Classe Pão, e comercialmente destinada à panificação. Já a “Farinha B”, provém de mescla de trigos 100% nacionais, com 40% de extração, classificada de acordo com a regulamentação brasileira como Grupo II – Classe Básico e comercialmente destinada à fabricação de biscoitos ou correção de parâmetros de extração de farinhas fortes, sendo considerada uma farinha fraca.

Tabela 1: Características físico-químicas e reológicas das farinhas A e B após período de estabilização.

	Farinha A	Farinha B
Umidade (%)	13,30	13,60
Cinzas – Base seca (%)	0,48	0,82
Número de Queda (s)	420	343
Farinografia		
<i>Absorção (%)</i>	57,10	59,70
<i>Desenvolvimento (min)</i>	12,10	7,20
<i>Estabilidade (min)</i>	22,80	11,9
Cor		
<i>L*</i>	91,95	90,95
<i>± a*</i>	-0,53	-0,37
<i>± b*</i>	10,70	11,32
Glúten		
<i>Índice de glúten</i>	98,80	76,90
<i>Glúten - base úmida (%)</i>	24,10	29,90
<i>Glúten - base seca (%)</i>	8,50	9,90
Alveografia		
<i>W (10⁻⁴ J)</i>	221	182
<i>Relação P/L</i>	1,31	0,77

3.2. Métodos

3.2.1. Determinação da atividade de α -Amilases

A atividade das alfa-amilases foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados, utilizando amido como substrato, proposto por BERNFELD (1955) e com modificações sugeridas por SANTOS et al. (2010), usando maltose como padrão. Os açúcares redutores foram dosados pelo método do ácido 3,5 dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

Uma solução de amido P.A. (Synth) foi usada como substrato. A solução foi preparada a partir de 1 g de amido diluído em 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M e pH 6,9, acrescido de 0,006 M de cloreto de sódio. Uma alíquota de 250 μ L desta solução foi incubada em banho-

maria, a 25 °C por 3 min, com 250 µL da solução contendo a enzima, previamente diluída. Após a reação, adicionou-se 500 µL de DNS e colocou-se a solução em banho de água fervente por 5 min. A solução foi resfriada em banho de gelo, adicionada de 1 mL de água destilada e centrifugada a 5000 x g durante 5 min para precipitação do veículo em que a enzima estava adsorvida. A absorbância do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro à 540 nm. Todas as leituras foram feitas em triplicata contra um branco reacional. A curva padrão foi feita a partir de maltose (Sigma-Aldrich), nas concentrações de 0,1 a 3,0 g.L⁻¹.

Uma unidade de atividade enzimática de α-amilase (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcares redutores, expressos como maltose por minuto, a 25 °C, sendo a atividade enzimática expressa em U.g⁻¹.

3.2.2. Determinação da atividade de Xilanases

A atividade de xilanases foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir de solução de xilana “birchwood” (Sigma-Aldrich), conforme descrito por BAILEY et al. (1992) e adaptado por PALMA e FURIGO JUNIOR (2003), usando maltose como padrão. Os açúcares redutores foram dosados pelo método do ácido 3,5 dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

O substrato foi preparado a partir de solução de xilana 1 % (p/v) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e fervida por 5 min com agitação ocasional. Uma alíquota de 900 µL da solução de xilana foi previamente aquecida a 50 °C por 5 min, e acrescida de 100 µL da solução contendo a enzima, previamente diluída. Após a reação, retirou-se uma alíquota de 500 µL, que foi adicionada de 1 mL de DNS e fervidos em banho-maria por 5 min, com posterior resfriamento em banho de gelo. Após, a solução foi diluída com 4 mL de água destilada e a absorbância medida em espectrofotômetro à 540 nm. Todas as leituras foram feitas em triplicata contra um branco reacional. A curva padrão foi feita a partir de xilose (Merck), nas concentrações de 0,2 a 1,0 g.L⁻¹.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcares redutores, expressos como xilose por minuto, a 50 °C, sendo a atividade enzimática expressa em U.g⁻¹.

3.2.3. Determinação da atividade de Glicose oxidase

A atividade de glicose oxidase foi determinada pelo método de CIUCU e PATROESCU (1984) através da redução de benzoquinona (BQ) para hidroquinona (HQ). Inicialmente foi

preparada uma solução de glicose (Merck) 0,55 M e deixada em temperatura ambiente durante 24 h para equilíbrio de seus anômeros α e β . Após, em uma cubeta foi adicionada 1 mL da solução de glicose, 500 mL de benzoquinona (Sigma-Aldrich) 0,1 % (p/v) solubilizada em tampão citrato 0,2 M (pH 5,0) e 470 μ L de tampão citrato 0,2 M (pH 5,0). A mistura foi equilibrada durante 5 min a 25 °C e, em seguida, adicionada de 30 μ L da solução contendo a enzima, adequadamente diluída. A mistura foi agitada e, imediatamente, o aumento na absorvância foi acompanhado em espectrofotômetro por 2 min a 290 nm. Todas as soluções foram preparadas usando-se água ultrapura.

A atividade de glicose oxidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a redução de 1 μ mol de BQ para HQ por minuto, a 25 °C, sendo a atividade enzimática expressa em U.g⁻¹.

3.2.4. Determinação da atividade de Lacase

A atividade da lacase foi determinada de acordo com o método de LEONOWICZ e GRZYWNOWICZ (1981), usando seringaldazina (Sigma-Aldrich) como substrato, com modificações sugeridas por GARCIA (2006). A reação iniciou-se com a adição de 100 μ L da solução de seringaldazina 1 mM (preparada em etanol absoluto) em 840 μ L de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e 60 μ L da solução contendo a enzima previamente diluída. A oxidação do substrato foi acompanhada em espectrofotômetro a 525 nm, por 5 a 10 min sob condições de temperatura controlada a 25 °C. Todas as leituras foram feitas em triplicatas contra um branco reacional.

Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μ mol de substrato por minuto, sob as condições de reação, considerando na fórmula que segue $\epsilon_{525} = 65.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$:

$$A = \frac{10^6 \times \Delta E}{\epsilon_{525} \times \Delta t}$$

Onde:

ϵ_{525} = coeficiente de extinção molar da seringaldazina;

ΔE = aumento da absorvância no comprimento específico;

Δt = tempo de reação em minutos.

3.2.5. Determinação da atividade de Lipase

A atividade de lipase foi determinada pelo método de titulação de ácidos graxos liberados por hidrólise usando azeite de oliva como substrato, de acordo com SOARES et al. (1999). O substrato foi preparado pela emulsão de azeite de oliva extra virgem e goma arábica a 7% (p/v), (1:1 óleo:goma). 1 mL de substrato foi adicionado de 0,8 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0) e 0,2 mL da solução enzimática apropriadamente diluída. A reação foi incubada em banho-maria a 37 °C por 5 min sob agitação e paralisada pela adição de 3 mL de acetona-etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos livres liberados foram titulados com solução de KOH 0,02 M, utilizando fenolftaleína como indicador. Todas as leituras foram feitas em triplicata contra um branco reacional.

A atividade de lipase foi calculada utilizando a equação a seguir, onde uma unidade de atividade (U) foi expressa como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de ácido graxo, a 37 °C, por minuto de reação.

$$U (\mu\text{mol mg} \cdot \text{min}) = \frac{(V_a - V_b) \times M \times D \times 10^3}{(t \times m)}$$

Onde:

D = diluição da amostra;

M= Concentração da solução de KOH (M);

m = massa de enzima (mg);

t = tempo de reação (min);

V_a = Volume de KOH gasto na reação (mL);

V_b = Volume de KOH gasto na titulação do branco (mL).

3.2.6. Determinação da atividade de Transglutaminase

A atividade da transglutaminase foi determinada pela formação de hidroxamato a partir do substrato N-CBZ-Gln-Gly, conforme método descrito por GROSSOWICZ et al. (1950) com modificações propostas por DE SOUZA et al. (2008), usando ácido γ-hidroxâmico-L-glutâmico (Sigma-Aldrich) como padrão. Inicialmente foram preparados 10 mL de substrato, através da mistura de tampão Tris-HCl 200 mM (pH 6,0), hidroxilamina 100 mM e CaCl₂ 50 mM em 6 mL de água ultrapura e agitados até completa dissolução. À esta solução foi acrescentada glutatona reduzida 10 mM e N-CBZ-Gln-Gly 30 mM e agitados até completa dissolução,

respeitando-se a ordem de cada reagente para facilitar sua solubilização. Após, o pH foi acertado com HCl 1M até pH 6,0, e o volume foi completado com água ultrapura até 10 mL. Uma alíquota de 350 µL da solução de substrato foi adicionada à 400 µL de solução contendo enzima, adequadamente diluída e agitada. A reação foi incubada a 37 °C durante 10 min e depois parada pela adição de 400 µL de reagente cloreto férrico ácido tricloroacético (1:1:1 (v/v/v) de ácido clorídrico 3 M, ácido tricloroacético a 12%, FeCl₃.6H₂O 5% diluído em HCl 0,1 M). Após 5 min, a solução foi centrifugada a 5000 × g, e a absorbância do sobrenadante foi medida a 525 nm em espectrofotômetro. Todas as soluções, inclusive a solução enzimática, foram preparadas com água ultrapura.

Uma unidade de atividade de transglutaminase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a formação de 1,0 µmol de ácido γ-hidroxâmico-L-glutâmico, por minuto, a 37 °C.

3.3. Análises Físico-químicas

Todos os ensaios físico-químicos foram realizados em triplicata no Laboratório de Qualidade do Moinho Tondo S.A.

3.3.1. Umidade

A umidade das amostras de farinha foi determinada conforme o método oficial 44-15.02 AACC (2009), através de medida direta por reflectância no infravermelho próximo (NIR), em um micro analisador infravermelho Gehaka IV 200 (Gehaka, Brasil), onde foram pesadas 3 g de amostra e acondicionadas no prato do equipamento, que foi mantido a 120 °C por 6 min. A umidade foi expressa em percentual.

3.3.2. Cinzas

O teor de minerais (cinzas) das amostras de farinha foi determinado por incineração pelo método oficial 08-01.01 AACC (2000). Foram pesadas 5 g de amostra em cadinho tarado e dessecado, e levado ao forno mufla à 570 °C até completa eliminação do carvão das amostras, quando restaram apenas cinzas esbranquiçadas. Estas foram pesadas e expressas em percentual de material mineral.

3.3.3. Cor

A cor das amostras de farinha foi determinada em colorímetro Minolta CR 310, de acordo com o método 14-22.01 AACC (2000), através do sistema CIELAB. As amostras de farinha foram colocadas em recipiente próprio de cor branca e sem reflexo; a lente do colorímetro foi posicionada sobre a amostra e o gatilho acionado. Os parâmetros L* (luminosidade), cromaticidade a* e cromaticidade b* foram determinados.

3.3.4. Teor de glúten e Índice de glúten

O teor de glúten e o índice de glúten das amostras de farinha foram determinados através da extração das proteínas do glúten, seguindo os métodos oficiais 38-12.01 e 38-12.02 AACC (2000), usando o equipamento Glutomatic System (Perten Instruments, Suécia). Foram pesadas 10 g de amostra, colocadas no misturador do equipamento e adicionadas de 4,8 mL de solução de NaCl 20% (p/v). Efetuou-se a mistura durante 20 s e automaticamente foi iniciada a lavagem do glúten com a solução salina durante 5 min, para extração de proteínas solúveis e amido. Após, a fração insolúvel, retida na peneira do misturador, foi colocada nas peneiras especiais (840 µm) da centrifuga do equipamento, onde foram centrifugadas durante 30 s a 6000 rpm. A fração permeada pela peneira foi raspada com uma espátula e pesada. A fração remanescente no equipamento foi coletada e adicionada à fração já pesada, cuja soma corresponde ao total de glúten úmido. A relação entre a fração remanescente na peneira e o total de glúten úmido configura o índice de glúten. A porção total foi colocada na estufa de secagem do equipamento (Glutork 2020) e mantida a 150 °C durante 4 min, correspondendo, após a secagem, ao glúten seco. Todas as medidas (glúten úmido, glúten seco e índice de glúten) foram expressas em percentual.

3.4. Análises Reológicas

Todos os ensaios reológicos foram realizados no Laboratório de Qualidade do Moinho Tondo S.A., sendo que as duas amostras de farinhas (puras) foram analisadas mensalmente, até a estabilização de suas características reológicas, a fim de que estas alterações, próprias do processo natural de “maturação”, não fossem confundidas posteriormente com os efeitos das enzimas empregadas.

3.4.1. Falling Number (Número de queda)

A atividade de α -amilase nas amostras de farinha foi determinada pelo método oficial Hagberg Falling Number, 56-81.03 AACC (2000). Foram pesadas aproximadamente 7 g de amostra - para farinhas com 14 % de umidade deve-se pesar 7 g de amostra, caso contrário deve-se utilizar a tabela de correção fornecida pelo fabricante – que foi colocada no tubo de ensaio do equipamento e adicionada de 25 mL de água destilada. A solução foi agitada até homogeneização e colocada na caldeira do aparelho Falling Number (Perten Instruments, Suécia) contendo água a 100 °C. Este, através de um êmbolo, misturou a solução por 60 s até completa gelatinização do amido. Após, iniciou-se automaticamente a contagem do tempo (s) até o êmbolo alcançar o fundo do tubo de ensaio, correspondendo proporcionalmente à redução da viscosidade da suspensão.

A medida da atividade enzimática (FN) é expressa em segundos, através da estimativa de sua capacidade de degradação de amido e não da quantidade real de enzima presente na amostra.

3.4.2. Farinografia

O teste de Farinografia foi conduzido em farinógrafo Brabender (Brabender Technologie, Alemanha) pelo método oficial 54-21.02 AACC (2000). O teste foi utilizado para avaliar as propriedades relacionadas à mistura de massas produzidas com cada amostra de farinha. Foram pesadas aproximadamente 300 g de farinha (para farinhas com 14% de umidade deve-se pesar 300 g de amostra, caso contrário deve-se utilizar a tabela de correção fornecida pelo fabricante), e colocadas na masseira do farinógrafo, equipado com 2 pás em formato de “Z” e um dinamômetro, que mede a força requerida para a mistura da amostra e reproduz graficamente as variações ocorridas durante o processo. Após homogeneização durante 60 s, foi iniciada a adição de água até que o pico do gráfico em construção atingisse a linha de 500 UB (Unidades Brabender). A quantidade de água foi registrada e a análise finalizada após 5 min da saída do gráfico da linha de 500 UB.

A partir desta análise foram estudados os seguintes parâmetros: capacidade de absorção de água (%); tempo de desenvolvimento (min) e tempo de estabilidade da massa (min).

3.4.3. Alveografia

A análise de alveografia foi realizada em alveógrafo NG Alveolink (Chopin Technologies, França) de acordo com o método oficial 54-30.02 AACC (2000). Foi pesada uma amostra de 250 g de farinha e adicionada de solução salina 20 % (p/v). Na masseira do equipamento, a massa foi misturada e após 8 min, foi extrusada, laminada e cortada em pequenos discos de circunferência e espessura uniformes, que ficaram armazenados na estufa do equipamento até 28 min do tempo total de análise. Após o descanso, os discos de massa foram inflados, sob pressão constante, por uma quantidade de ar suficiente para a formação de uma bolha de massa, até sua extensão total e ruptura.

O alveograma resultante apresenta graficamente os dados obtidos em cada ensaio, mensurando: energia de deformação W ($\times 10^{-4}$ J); tenacidade da massa P (mm); extensibilidade da massa L (mm) e a razão P/L que mede a proporcionalidade entre as duas grandezas.

3.5. Efeitos da adição individual de enzimas nos parâmetros reológicos da farinha A

Para entendimento dos efeitos das concentrações de cada enzima sobre as propriedades reológicas da farinha de trigo, elas foram avaliadas individualmente nas seguintes concentrações: 0, 25, 150, 250, 333, 583 e 833 ($U.kg^{-1}$ de farinha). Estas faixas de concentrações foram determinadas em testes prévios, onde não foram observadas alterações na reologia em concentrações acima de $833 U.kg^{-1}$ ou em intervalos de concentrações mais estreitos do que os mencionados.

Nesta etapa do estudo, elas foram adicionadas somente na Farinha A, pois esta é uma farinha cujos parâmetros reológicos, com exceção do Falling Number (FN), já estavam ajustados nas faixas recomendadas para uma farinha de panificação industrial. Assim, foi possível observar o real efeito de cada enzima, sem a interferência de mudanças abruptas de uma farinha não padronizada.

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), através do software Statistica 12 (StatSoft, EUA).

3.6. Efeitos da adição combinada das enzimas nas farinhas A e B

Os efeitos combinados das 9 enzimas sobre as propriedades reológicas das duas amostras de farinha, foram avaliados através de uma sequência de dois planejamentos experimentais, como descrito a seguir.

3.6.1. Planejamento experimental Plackett-Burman

Primeiramente, foi realizado um planejamento experimental Plackett-Burman 11/12 para a triagem das enzimas mais importantes sobre as propriedades reológicas da farinha. As concentrações de cada enzima selecionadas na etapa anterior (adição individual) foram utilizadas na construção da matriz (Tabela 2), onde as enzimas foram variadas em 2 níveis, com 3 repetições no ponto central, onde o nível inferior (-1) = ausência da enzima; o ponto central (0) = 75 U.kg⁻¹ e o nível superior (+1) = 150 U.kg⁻¹. As variáveis de 1 a 9 representam cada enzima, e as variáveis 10 e 11 foram utilizados para o cálculo do erro puro.

A mesma matriz e as mesmas concentrações de enzimas foram utilizadas para ambas amostras de farinha (farinha A e farinha B), a fim de se verificar o comportamento sobre as propriedades reológicas de cada uma delas.

Tabela 2: Matriz de Plackett-Burman 11/12.

Ensaio	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Variáveis: 1 = AMY-F, 2 = AMY-B, 3 = AMY-M, 4 = XYL-F, 5 = XYL-B, 6 = GOX, 7 = LAC, 8 = LIP, 9 = TG, 10 e 11 = variáveis inertes.

3.6.2. Planejamento Fatorial completo 2³

As enzimas identificadas no planejamento de Plackett-Burman, que apresentaram efeitos benéficos sobre as propriedades reológicas das farinhas A e B, foram selecionadas para

otimização através do planejamento fatorial 2^3 completo (8 experimentos e 3 repetições no ponto central) como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3: Planejamento fatorial 2^3 completo.

Ensaio	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Para a farinha A, as seguintes enzimas e seus respectivos níveis foram testados conforme apresentado na Tabela 4, mantendo fixas as enzimas Lipase (150 U.Kg^{-1}) e α -Amilase bacteriana (150 U.Kg^{-1}).

Tabela 4: Variáveis e níveis estudados para a farinha A.

Variáveis*	Níveis		
	-1	0	1
X1 - AMY-M (U.Kg^{-1})	100	133	166
X2 - XYL-B (U.Kg^{-1})	100	150	200
X3 - GOX (U.Kg^{-1})	50	100	150

*AMY-M: α -amilase maltogênica; XYL-B: xilanase bacteriana; GOX: glicose oxidase.

Para a farinha B, as seguintes enzimas e seus respectivos níveis foram testados conforme apresentado na Tabela 5, mantendo fixa a enzima Lipase (150 U.Kg^{-1}).

Tabela 5: Variáveis e níveis estudados para a farinha B.

Variáveis*	Níveis		
	-1	0	1
X1 - AMY-B (U.Kg⁻¹)	100	150	200
X2 - GOX (U.Kg⁻¹)	100	150	200
X3 - LAC (U.Kg⁻¹)	100	150	200

*AMY-B: α -amilase bacteriana; GOX: glicose oxidase; LAC: lacase.

3.7. Efeitos da aditivção química nos parâmetros reológicos das farinhas A e B

Para comparação aos tratamentos enzimáticos, as duas amostras de farinha foram adicionadas do oxidante químico azodicarbonamida (ADA) em diferentes concentrações, onde foram observadas as alterações nas suas características reológicas.

Para a farinha A, o FN foi ajustado pela adição de α -amilase (AMY-B 166 U.kg⁻¹ e AMY-M 133 U.kg⁻¹) - identificadas previamente - e ADA foi testada nas concentrações de 5 e 10 ppm. Para a farinha B, o FN foi ajustado pela adição de α -amilase (AMY-B 100 U.kg⁻¹) - identificada previamente - e ADA foi testada nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 ppm (concentração máxima permitida pela legislação brasileira).

CAPÍTULO III – ARTIGO 1

Microbial enzymes as substitutes of chemical additives in baking wheat flour – Part I: individual effects of nine enzymes on flour dough rheology

Neste trabalho foram estudados os efeitos da concentração de 9 enzimas comerciais nos parâmetros reológicos de uma farinha de trigo padrão para panificação sem aditivação prévia. As enzimas foram avaliadas individualmente nas seguintes concentrações: 25, 150, 250, 333, 583 e 833 (U.kg⁻¹). Os efeitos das concentrações de cada enzima nos parâmetros reológicos da farinha A foram avaliados através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os resultados estão apresentados no artigo que segue, submetido à publicação no *Food and Bioprocess Technology: An International Journal*.

Microbial enzymes as substitutes of chemical additives in baking wheat flour – Part I: individual effects of nine enzymes on flour dough rheology

Micheli Maria Bueno^a, Roberta Cruz Silveira Thys^b, Rafael C. Rodrigues^{a,*}

^aBiotechnology, Bioprocess and Biocatalysis Group, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

^bBaking Laboratory, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author:

Tel.: +55 51 3308 7793; fax: +55 51 3308 7048

E-mail address: rafaelcrodrigues@ufrgs.br (R. C. Rodrigues) - www.ufrgs.br/bbb

ABSTRACT

In this work, we evaluated the effects of nine commercial enzymes – fungal (AMY-F), bacterial (AMY-B) and maltogenic (AMY-M) α -amylases, fungal (XYL-F) and bacterial (XYL-B) xylanases, glucose oxidase (GOX), laccase (LAC), lipase (LIP) and transglutaminase (TG) on the rheological properties of common wheat flour. Falling Number (FN), farinography and alveography analysis were carried out varying the enzymes concentrations from 25 to 833 U.kg⁻¹ aiming to reach baking quality. α -Amylases affected mainly the farinographic properties, reducing the water absorption (WA) and stability time (ST). AMY-B was the most effective enzyme to adjust the FN, needing 150 U.kg⁻¹, while for AMY-F and AMY-M it was necessary 583 U.kg⁻¹. In all tests, XYL-B was more efficient than XYL-F, but both improved the W value and P/L ratio. At 25 U.kg⁻¹, GOX increased the development time (DT), as well as the ST and the P/L ratio. LAC, which is not a commonly used enzyme, significantly improved the ST and W value, being an interesting oxidant agent. Moreover, the ideal enzymes concentrations determined were compared to those suggested by the suppliers, and it was observed under and over dosages, especially for α -amylases and xylanases.

Keywords: enzymes; wheat flour; rheological analysis; Falling Number; farinography; alveography.

1. INTRODUCTION

The growing in the baking industry mechanization and the demand for a wide range of bread products has been a factor for the necessity to modulate structure and viscoelastic properties of wheat flour doughs, being important in the quality of final products (Dunnewind et al. 2002). The quality of wheat flour depends on a number of factors, such as the wheat variety, climatic variations, cultivation and storage conditions (Cauvain and Young 2007). The resulting flours have specific properties, measured by Falling Number (FN) value – also known as diastatic or α -amylase activity – farinographic and alveographic tests, which determines their potential to application (Dunnewind et al. 2002). Wheat flours for industrial bread making require specific rheological characteristics, as intermediate α -amylase activity, low development time, high water absorption capacity and stability to mechanical work. Besides, it was also needed resistance and malleability to the extension, with balance between elasticity and extensibility (Cauvain and Young 2007). These properties are used to estimate the behavior of the doughs during the bread making process and the quality of the final products.

When these properties are not suitable for such purpose, rheological parameters should be corrected. Even strong flours often need correction of rheological parameters, especially FN, performed mainly by the addition of commercial α -amylase (Barrera et al. 2015; Goesaert et al. 2009b). However, the standardization of the FN causes a negative distortion of the other rheological parameters, mainly by the hydrolysis of the wheat starch, reducing its water absorption, viscosity, stability and resistance, which characterizes a weakening of the flour (Barrera et al. 2015; Dunnewind et al. 2002; Leman et al. 2005). In order to minimize these side effects, the wheat milling industry usually mix different flours to the correction of rheological parameters (AACC 2005). However, this method, based on trial and error, is costly and inefficient, susceptible to waste of good raw material. Another usual alternative is the addition of chemical compounds, mainly oxidizing agents such as azodicarbonamide (ADA), to dough strengthening. However, the use of ADA has been widely associated with numerous health problems and allergies, and its use is banned in many countries and subject to heavy penalties for the non-compliance (Csáki 2011; Lerner and Matthias 2015; Noonan et al. 2008; Roberts et al. 2013; Ye et al. 2011).

In general, treatments with enzymes has been preferred to the addition of chemical additives since they are natural, highly specific and completely safe to health. Furthermore, enzymes do not remain active in the final product and, therefore, do not have to appear on the label (Caballero et al. 2007). Among the enzymes, xylanases promote an improvement in the

flour rheology by increasing the extensibility and malleability of the dough caused by hydrolysis of water unextractable arabinoxylans (Ahmad et al. 2013). Oxidative enzymes like glucose oxidase and laccase have a strengthening impact on the dough by promotion of disulfide linkages in gluten protein and gelation of arabinoxylans feruloylated, affecting positively the rheology of dough weakened by amylases (Goesaert et al. 2007). Additionally, transglutaminase has an strengthening effect in the dough rheology by the protein cross-linking promotion, improving the gluten network (Collar and Bollain 2005). And, finally, lipase improves dough rheology by the hydrolysis of the wheat flour lipids, releasing fatty acids that have good emulsifiers properties, promoting a lipid bind with the gluten proteins, stabilizing the gluten network (Gerits et al. 2014a).

Nevertheless, the main difficult for using these enzymes in flour correction is the limited knowledge about their effects on the rheological parameters. Specifically, in what concentrations these enzymes improve flour quality. In general, the wheat milling industry follow the dosages indicated by the enzyme suppliers, however, enzyme effects depend on the initial characteristics of the raw material, which can result in over or under-dosage. Thus, in this work, we presented a comprehensive study about the effects of 9 commercial enzymes – 3 types of α -amylases: fungal (AMY-F), bacterial (AMY-B) and maltogenic (AMY-M) amylases; 2 types of xylanases: fungal (XYL-F) and bacterial (XYL-B), glucose oxidase (GOX), laccase (LAC), lipase (LIP) and transglutaminase (TG) – on rheological parameters of baking flour. We tested each enzyme individually in wheat flour, without any other additive, measuring farinographic and alveographic parameters. Besides, we compared our results with the recommended indications by the manufactures, discussing about under or over dosages.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Material

2.1.1. Enzymes

The enzymes were kindly provided by suppliers listed below and were selected under the condition of being pure, that is, without being mixed or complexed with other enzyme. For comparative purposes, the enzymes activities were determined and expressed as U.g⁻¹ of commercial preparation.

The following enzymes were tested: fungal α -amylase Veron M4 from *Aspergillus oryzae* (AB Enzymes), AMY-F; bacterial α -amylase Spring Alfa Bac 7500 from *Bacillus amyloliquefaciens* (Granolab), AMY-B; maltogenic α -amylase Veron Mac from *Bacillus stearothersophilus* (AB Enzymes), AMY-M; fungal xylanase Veron 191 S from *Aspergillus*

niger (AB Enzymes), XYL-F; bacterial xylanase Veron RL from *Bacillus subtilis* (AB Enzymes), XYL-B; glucose oxidase Spring Gluz from *Bacillus subtilis* (Granolab), GOX; laccase Novoprime Base 268 from *Aspergillus oryzae* (Novozymes), LAC; lipase Enzymill FL from *Humicola spp* (Vallens Food Ingredients), LIP and transglutaminase Veron TG from *Streptoverticilium mobareense* (AB Enzymes), TG.

2.1.2. Wheat flour

The flour sample was provided by Tondo S.A. (Forqueta, RS) without blanched, and any chemical or enzyme additives. The flour was stored (at 25 °C and 70 % of relative humidity, during 90 days) before use to stabilize the naturally maturing process. Falling Number, farinographic and alveographic parameters were followed during the storage until constant value, as stabilization end-point. The flour was composed of a mix of the Brazilian (50%), American (10%) and Argentine (40%) wheat with an extraction of 70%, without addition of Fe and folic acid and classified as Type I, which according to the Brazilian regulation is categorized as commercially designed for baking.

The specifications of the flour, at time 0 and after 90 days of storage, were, respectively: moisture, 13.2 and 13.30 %; Ash – dry weight, 0.49 and 0.48 %; Falling Number, 395 and 420 s; Gluten – dry weight, 8.5 and 8.5%; Gluten index, 98.90 and 98.80; Colour – L* (whiteness or brightness/darkness), 92.04 and 91.95; a* (redness/greenness), -0.66 and -0.53; and b* (yellowness/ blueness), 10.77 and 10.70. The farinographic and alveographic parameters were: Water absorption (WA), 56.0 and 57.1 %; Development time (DT), 14.0 and 12.1 min; Stability time (ST), 23.8 and 22.8 min; Deformation energy (W), 299 and 221 x 10⁻⁴ J; Curve configuration (P/L ratio), 1.47 and 1.31.

2.2. Methods

2.2.1. Enzyme activities

α -Amylases activities (AMY-F, AMY-B and AMY-M) were determined by the starch hydrolysis by the release of reducing sugars proposed by Bernfeld (1955) with changes proposed by Santos et al. (2010), using maltose as standard. Reducing sugars were measured by 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) method (Miller 1959). Soluble starch P.A. (Synth) was used as substrate (1 % w/v, in 0.02 M sodium phosphate buffer, pH 6.9, and 0.006 M sodium chloride). An aliquot of 250 μ L of the substrate solution was incubated at 37 °C for 10 min with 250 μ L of enzyme solution, properly diluted. After the reaction, 500 μ L of DNS was added and the mixture was boiled for 5 min. The reaction was cooled in an ice bath, added 1 mL of distilled

water and centrifuged at $5000 \times g$ for 5 min to precipitate the enzyme vehicle. Then, the absorbance of the supernatant was measured in a spectrophotometer at 540 nm. One α -amylase activity unit (U) was defined as the amount of enzyme capable of release 1 μmol of reducing sugars, expressed as maltose, per minute at 25 °C.

Xylanases activities (XYL-F and XYL-B) were determined by the amount of reducing sugars released from xylan "birchwood" (Sigma Aldrich), as described by Bailey et al. (1992), and modifications proposed by Palma (2003). Xylan solution (1 %, w/v, in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0) was preheated at 50 °C for 5 min. Then, to complete 900 μL of substrate solution, it was added 100 μL of enzyme solution, properly diluted, and incubated for 5 min. After, 1 mL of DNS was added and the mixture was boiled for 5 min and then cooled in ice bath to room temperature. Then, it was diluted with 4 mL of distilled water and the absorbance was read in a spectrophotometer at 540 nm. One xylanase activity unit (U) was defined as the amount of enzyme that releases 1 μmol of reducing sugar, expressed as xylose, per minute at 50 °C.

The glucose oxidase (GOX) activity was determined by Ciucu and Patroescu (1984) method by the benzoquinone (BQ) reduction to hydroquinone (HQ). It was added in a cuvette 1 mL of glucose solution 0.55 M (Merck), 500 μL of benzoquinone (Sigma Aldrich) 0.1% (w/v) solubilized in citrate buffer (pH 5.0; 0.2 M) and 470 μL of citrate buffer (pH 5.0; 0.2 M). The mixture was equilibrated for 5 min at 25 °C. Then, 30 μL of glucose oxidase solution, properly diluted, was added, stirred and the increase in the absorbance was followed for 2 min at 290 nm. All solutions were prepared using ultrapure water. Glucose oxidase activity was defined as the amount of enzyme which catalyzed the reduction of 1 μmol of BQ to HQ per minute at 25 °C and expressed as $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ of enzyme powder.

Laccase (LAC) activity was determined according to the Leonowicz & Grzywnowicz (1981) method using syringaldazine (Sigma Aldrich) as substrate with modifications suggested by Garcia (2006). The reaction started adding 100 μL of syringaldazine (1 mM, in absolute ethanol) to 840 μL of 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 and 60 μL of enzyme previously diluted. The substrate oxidation was followed from 5 to 10 min. The reaction was carried out under controlled temperature of 25 °C, measuring the substrate oxidation at 525 nm. The ϵ_{525} of the syringaldazine is $65000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. One laccase activity unit (U) was defined as the amount of enzyme that oxidizes 1 μmol of syringaldazine per minute at reaction conditions.

Lipase (LIP) activity was determined by titration of released fatty acids by the hydrolysis using olive oil as substrate, according to Soares (1999). Briefly, 1 mL of the substrate prepared by the emulsion of extra virgin olive oil with gum arabic 7 % (w/v), (1:1 oil:gum),

was added to 0.8 mL of phosphate buffer 0.1 M (pH 7.0) and 0.2 mL of enzyme solution properly diluted. The reaction was incubated at 37 °C for 5 min under agitation, and stopped adding 3 mL of 1:1 ethanol-acetone solution (v/v). The free fatty acids released were titrated with KOH 0.02 M, using phenolphthalein as indicator. One lipase activity unit (U) was defined as the amount of enzyme necessary to release 1 μ mol of free fatty acid per minute at reaction conditions.

The transglutaminase (TG) activity was determined by hydroxamate formation from N-CBZ-Gln-Gly substrate, using the method described by Grossowicz et al. (1950) with modifications proposed by Souza et al. (2008). To 400 μ L of properly diluted enzyme solution, it was added 400 μ L of substrate solution (Tris-HCl buffer 200 mM (pH 6.0), hydroxylamine 100 mM, CaCl₂ 50 mM, reduced glutathione 10 mM and N-CBZ-Gln-Gly 30 mM). The reaction mixture was incubated at 37 °C for 10 min and then stopped by adding 400 μ L of ferric chloride trichloroacetic acid reagent (1:1:1 (v/v/v) of HCl 3 N, trichloroacetic acid 12%, FeCl₃.6H₂O 5% diluted in HCl 0.1 N). After 5 min, the solution was centrifuged at 5000 \times g, and the absorbance of the supernatant was measured at 525 nm. One transglutaminase activity unit (U) was defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1.0 μ mol of L-glutamic acid γ -monohydroxamate per minute at 37 °C.

2.2.2. Physical-chemical analysis

Moisture was measured by Near-Infrared Spectral Reflectance (NIR), method 44-15.02 (AACC 2009) in an infrared micro-analyzer Gehaka IV 200 (Gehaka, Brazil). Gluten content and gluten index were determined by extracting gluten proteins, following the official methods, 38-12.01 e 38-12.02 (AACC 2009), respectively, using the Glutomatic System equipment (Perten, Sweden). Ash content was determined by incineration, method 08-01.01 (AACC 2009). The color was determined by CIELAB scale, using a Colorimeter Minolta CR 310, method 14-22.01 (AACC 2000).

2.2.3. Rheological analysis

The Falling Number was determined according to official Hagberg Falling Number by the method 56–81.03 (AACC 2009). Farinographic assays were performed in farinograph Brabender (Brabender Instruments, Germany) following the official method 54-21.02 (AACC 2009). It was studied the following parameters: flour water absorption (%), dough development time (min) and dough stability time (min). The alveographic assays were carried out in an Alveograph NG Alveolink (Chopin Technologies, France) following the official method 54-

30.02 (AACC 2009), measuring the deformation energy W ($\times 10^{-4}$ J), dough tenacity P , dough extensibility L and their P/L ratio.

2.2.4. Effects of enzymes addition in flour rheology

The enzymes were added to the wheat flour, individually, varying their concentrations from 0 to 833 U.kg⁻¹ of flour. These ranges were previously determined, where it was not observed any change in concentrations above 833 U.kg⁻¹ of flour. After addition, all rheological parameters were measured and the effects of enzyme concentration in flour rheology were analyzed.

2.2.5. Statistical analysis

The statistical analysis of results was carried out using Statistica 12.0 (Statsoft, USA), by analysis of variance (ANOVA). Data presented normal distribution and samples were compared by Tukey's test ($p \leq 0.05$).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Enzymatic activities characterization

Firstly, in order to compare the different enzymes, especially when more than one enzyme source was tested, all enzymatic activities were measured by standard methods commonly used in the literature. This was necessary because the suppliers did not mention their methods used to determine the enzymatic activity, and more than this, they recommend the enzyme application based in the mass of enzyme preparation by mass of flour, as can be seen in Table 1. Thus, it is impossible to compare preparations from different sources or different suppliers. Therefore, the activity expressed in U.g⁻¹ of each commercial preparation allows, as stated before, a fair comparison, minimizing the possible differences of each manufacturer.

Moreover, it can be observed that the measured activities were very different from that provided by the manufactures. This is mainly, due to different methods and different conditions for measuring the enzymes activities. In the next experiments, the activities used to evaluate the enzymatic effects in dough rheology were based in the measured activities presented in Table 1.

Table 1: Enzymes characteristics and measured activities.

Enzyme	Code	Organism	Measured activity	Activity declared by the manufacturer
Fungal α -amylase	AMY-F	<i>Aspergillus oryzae</i>	2400 U.g ⁻¹	1728 AZ.g ⁻¹
Bacterial α -amylase	AMY-B	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1800 U.g ⁻¹	7500 UAM.g ⁻¹
Maltogenic α -amylase	AMY-M	<i>B. stearothersophilus</i>	2079 U.g ⁻¹	Not declared
Fungal xylanase	XYL-F	<i>A. niger</i>	2194 U.g ⁻¹	1700 XylH.g ⁻¹
Bacterial xylanase	XYL-B	<i>B. subtilis</i>	2077 U.g ⁻¹	568 XylH.g ⁻¹
Glucose oxidase	GOX	<i>B. subtilis</i>	2376 U.g ⁻¹	10000 GODU.g ⁻¹
Laccase	LAC	<i>A. oryzae</i>	260 U.g ⁻¹	800 LAMU.g ⁻¹
Lipase	LIP	<i>Humicola</i> spp	5700 U.g ⁻¹	9000 U.g ⁻¹
Transglutaminase	TG	<i>Streptoverticilium mobarense</i>	1400 U.g ⁻¹	100 TGU.g ⁻¹

3.2. Individual effects of enzymes on rheological proprieties of wheat flour

Industrial wheat flours should have specific rheological parameters that will ensure the quality of the final products. If the final use is baking, the following parameters should be adjusted in specific ranges: falling number (FN), 250 - 320 s, water absorption (WA), 56 - 57%, development time (DT), 4 - 10 min, and stability time (ST), > 15 min. Values below or above these, may result in changes in flour functionality and machinability (Cauvain and Young 2006; Pizzinatto et al. 2004). Additionally, alveographic parameters should range from 200 to 300 (10⁻⁴ J) for W and a P/L ratio above 0.88 (Pizzinatto et al. 2004).

In all studied concentrations, the enzymes did not demonstrate any effect on flour color and gluten content. Enzymes such as glucose oxidase and laccase only have bleaching action on flour, when associated with water and mechanical work, through hydrogen peroxide formation and carotenoids pigments oxidation (Bonet et al. 2006). Effects of enzymes, such as transglutaminase and glucose oxidase, on gluten are related with interaction forces between protein chains to improve the gluten quality, which is dependent of the initial content of gliadin and glutenin of the flour (Caballero et al. 2007; Collar and Bollain 2005).

3.2.1. Effects of α -amylases concentration

Although the flour had good rheological properties, the α -amylase activity was low. Industrial wheat flours to baking should have an ideal FN around 250 – 320 s, because low α -amylase activity (FN > 320 s) results in opaque breads, with dried crisp crumb and low

volume (Cauvain and Young 2007; Goesaert et al. 2009b). On the other hand, excessive α -amylase activity (FN < 250 s) generates a high saccharification of starch molecules during the baking process, resulting in gummy low volume breads with a dark crust (Caballero et al. 2007; Van der Maarel et al. 2002).

Bacterial amylase (AMY-B) presented superior performance than fungal and maltogenic amylases (AMY-F; AMY-M) in the FN reduction. As shown in the Figure 1, with a concentration of 150 U.kg^{-1} , AMY-B reduced the FN from 420 to 306 s, while for AMY-F and AMY-M it was necessary 583 U.kg^{-1} to obtain same result. AMY-F and AMY-M were statistically equal ($p > 0.05$), and both were different from AMY-B. This difference can be explained because bacterial amylases have inactivation temperature about $90 \text{ }^\circ\text{C}$, while AMY-F and AMY-M are inactivated at $60 \text{ }^\circ\text{C}$ and $70 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively (Cauvain and Young 2007). Thus, to adjust the FN, the ideal values were 150 U.kg^{-1} of AMY-B, and 583 U.kg^{-1} of AMY-F and AMY-M.

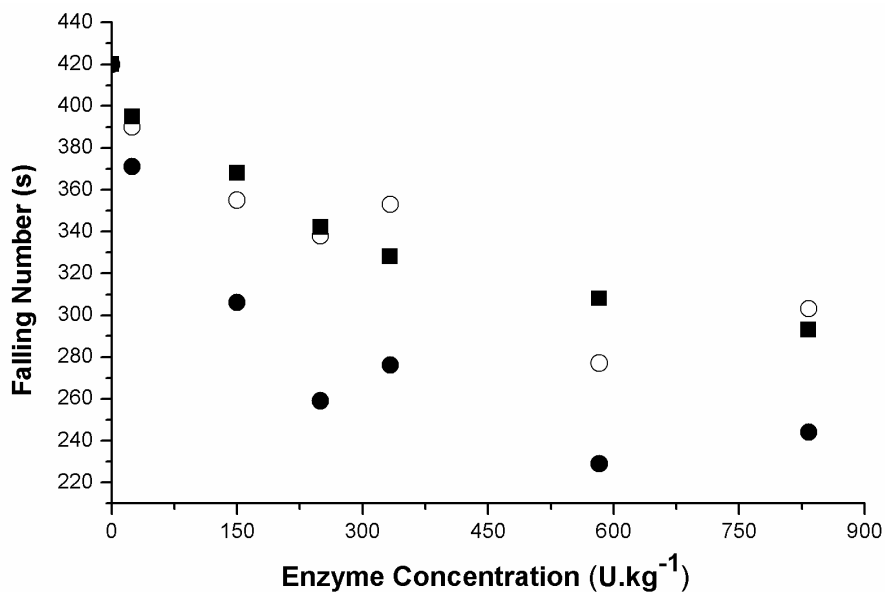


Figure 1: Effect of α -amylases concentration on Falling Number. (●) AMY-B; (■) AMY-F; (○) AMY-M.

According to Cauvain and Young (2007), water absorption (WA) around 56 - 57 % is ideal for dough development during baking process; values below or above this, may result in changes in its functionality and machinability. As it was shown in Table 2, with the increasing in the concentration of AMY-F and AMY-B, there was a decrease in the WA of flour, from 57.1 % (control) to 53.8 % (AMY-F) and 53.3 % (AMY-B) at the highest enzyme concentration (833 U.kg^{-1}). AMY-M did not affect the water absorption even at high concentration

(833 U.kg⁻¹). Thus, to maintain a proper water absorption, it is needed a minimal concentration for AMY-F and AMY-B.

Table 2: Concentration effects of amylases on rheological parameters of flour.

Enzyme	Enzyme Concentration (U.kg ⁻¹ flour)	Farinographic parameters			Alveographic parameters	
		WA (%)	DT (min)	ST (min)	W (10 ⁻⁴ J)	P/L
AMY-F	0	57.1 a	12.1 a	22.8 b	221 c	1.31 a
	25	56.2 b	12.0 a	23.7 a	221 c	1.29 a
	150	55.2 c	7.0 e	18.8 e	204 d	0.96 b
	250	54.9 c	10.1 c	21.1 c	199 e	1.15 ab
	333	54.5 d	8.5 d	16.7 f	166 f	1.15 ab
	583	54.1 e	10.2 c	16.6 f	253 a	0.85 b
	833	53.8 e	10.7 b	19.2 d	235 b	0.95 b
AMY-B	0	57.1 a	12.1 a	22.8 g	221 c	1.31 b
	25	55.8 b	10.9 b	20.9 a	189 e	1.86 a
	150	54.7 c	10.3 c	19.5 b	237 b	1.27 b
	250	54.3 d	10.1 cd	17.9 e	255 a	1.05 b
	333	56.4 e	8.0 f	20.8 a	222 c	1.24 b
	583	53.8 f	9.4 e	18.8 c	238 b	1.01 b
	833	53.3 g	9.8 d	16.4 f	200 d	1.20 b
AMY-M	0	57.1 a	12.1 e	22.8 a	221 b	1.31 abc
	25	57.1 a	15.7 b	19,9 d	223 b	1.42 ab
	150	57.0 ab	15.9 ab	22.9 a	230 a	1.38 ac
	250	56.8 ab	14.1 c	20.7 c	223 b	1.42 a
	333	57.1 a	16.1 a	20.0 d	198 d	1.47 a
	583	56.8 ab	14.1 c	19.0 e	229 a	1.10 c
	833	56.7 b	13.7 d	22.0 b	207 c	1.11 bc

* Same letters in the same column, for each enzyme, are statistically equal by Tukey's test ($p < 0.05$).

When the bonds of starch molecules are broken, their water absorption capacity is reduced. According to Leman et al. (2005), endo-amylases, such as AMY-F and AMY-B, attack the internal α -1,4 linked chains of amylose and amylopectin, releasing α -dextrins limit (low molecular weight). Some reports suggest that AMY-M may act as endo but preferably as

exo-amylase, attacking the external chains of amylopectin and releasing intermediate molecular weight dextrans (maltose, maltotriose and maltotetraose), without requiring a non-reducing end (Goesaert et al. 2010; Goesaert et al. 2009a; Leman et al. 2005). Thus, the external chains of amylopectin become very short to crystallize, inhibiting the formation of crystalline junction area, limiting the recrystallization of amylopectin and, consequently, immobilizing the water in the starch granule (Goesaert et al. 2007; Goesaert et al. 2009b; Hu et al. 2012; Van der Maarel et al. 2002).

AMY-F and AMY-B reduced the development time (DT), while AMY-M increased this parameter (Table 2). The major starch hydrolysis promoted by AMY-F and AMY-B led to a reduction in the sample viscosity, decreasing the development time. On the other hand, the smaller starch hydrolysis promoted by AMY-M, required more mechanical work to achieve the optimal development of the dough. The same effects were observed on flour stability, where AMY-F and AMY-B presented stronger effect than AMY-M reducing the stability time (ST). As discussed in the literature, a short development time, around 4 - 10 min (Pizzinatto et al. 2004), and a high stability time, more than 15 min, is desired for a baking flour. A fast development and good stability to mechanical process, could minimize the losing during the industrial and automated bread production (Cauvain and Young 2006).

Thus, considering the farinographic parameters, 250 U.kg⁻¹ for AMY-F promoted a desirable reduction on DT, with a minimal interference on the ST, while for AMY-B, a minimum concentration of 25 U.kg⁻¹ promoted the same results. In the case of AMY-M, even at the highest concentration used, it was not possible to reduce the development time, although the stability was undesirably reduced at all concentrations, with exception of 150 U.kg⁻¹, which was not statistically different ($p > 0.05$) from the control.

As can be seen, α -amylases presented smaller interferences on alveographic parameters than to the FN and farinographic tests. The results showed at the 150, 583 and 833 (U.kg⁻¹), AMY-F reduced the P/L ratio compared to the control. This means that the dough tenacity was reduced while its extensibility increased, demonstrating a high degree of depolymerization of the wheat starch. However, it was possible to observe that the effects in W values were independent of enzyme concentration. Same result were found by Caballero et al. (2005), where polysaccharide degrading enzymes did not present significant effects on alveographic properties compared to gluten crosslinking and gluten degrading enzymes, probably because of the gluten network influence on rheological behavior of dough.

Most of flours designed to baking industry require adjustments in the FN to ideal ranges (250 – 320 s), by the addition of commercial α -amylases. According to our results, it is

necessary a concentration of 150 U.kg⁻¹ of AMY-B, or 583 U.kg⁻¹ of AMY-F and AMY-M. Consequently, these corrections resulted in negative changes in the remaining rheological parameters.

3.2.2. Effects of xylanases concentration

Wheat flour arabinoxylans (AX) are the principal components of the non-starch polysaccharides cell wall material and present a high water-binding capacity, which are technologically important for the baking procedure. Xylanase attacks the backbone of AX and breaks it in smaller units, like as xylose and arabinose, releasing a molecule of water and modifying its functionality, improving the bread texture and volume (Moers et al. 2005).

As can be seen on Table 3, fungal xylanase (XYL-F) and bacterial xylanase (XYL-B) presented a small influence on FN in comparison to the control, although both enzymes have not any starch degradation action. One possible explanation for that is the fact that the falling number is a viscosimetric method, which has a reduction on the viscosity of the analysed suspension when the xylanases break the AX, decreasing the water-binding capacity, and resulting in a false effect on the FN. Another hypothesis is, because the AX is linked in starch structure, steric hindrances difficult the substrate access to natural amylases presented in the flour. When the AXs are hydrolyzed by xylanases, it occurs the liberation of these fractions of starch molecule, facilitating the access to the natural amylases act on the starch, even at low concentration.

XYL-F did not change the WA, while XYL-B promoted an undesirable reduction in this property, proportional to the increase of its concentration. Ahmad et al. (2013) showed that for an untreated flour (control) with a maximum WA of 57.6 %, the addition of fungal xylanase at the concentrations of 200 U.kg⁻¹ and 400 U.kg⁻¹, the WA decreased to 56.4 % and 55.7 %, respectively. The most important property of arabinoxylan is its water-binding potential, where one gram of arabinoxylan can bind up to 15 g of water (Courtin and Delcour 2001). According to Ahmad et al. (2013), xylanase breaks down larger molecules of carbohydrates into smaller ones having low water-binding capacities, resulting in reduced water absorption.

Table 3: Concentration effects of fungal and bacterial xylanases on rheological parameters of flour.

Enzyme	Enzyme concentration (U.kg ⁻¹ flour)	FN (s)	Farinographic parameters			Alveographic parameters	
			WA (%)	DT (min)	ST (min)	W (10 ⁻⁴ J)	P/L
XYL-F	0	420 a	57.1 cd	12.1 f	22.8 c	221 c	1.31 ab
	25	406 d	57.0 d	10.8 g	22.7 c	240 a	1.50 a
	150	400 e	57.1 cd	14.3 b	21.7 d	232 b	1.40 a
	250	398 e	57.4 ab	14.3 b	18.9 e	213 d	0.80 c
	333	416 b	57.3 bc	12.9 c	24.0 a	206 e	1.05 bc
	583	412 c	57.6 a	14.6 a	23.7 b	206 e	0.68 c
	833	400 e	57.3 bc	12.4 e	17.9 f	176 f	0.67 c
XYL-B	0	420 a	57.1 b	12.1 b	22.8 a	221 a	1.31 ab
	25	420 a	57.2 b	13.4 a	18.3 d	207 b	1.06 bc
	150	394 d	57.5 a	12.1 b	22.0 b	162 e	1.01 c
	250	399 c	57.3 ab	12.1 b	17.5 e	192 c	0.89 c
	333	413 b	57.1 b	12.2 b	20.4 c	141 g	1.47 a
	583	390 e	56.4 c	11.5 c	16.5 f	172 d	1.07 bc
	833	400 c	55.7 d	8.5 d	15.3 g	156 f	1.0 c

*Same letters in the same column, for each enzyme, are statistically equal by Tukey's test ($p < 0.05$).

XYL-F at 25 U.kg⁻¹ reduced the development time and at 583 U.kg⁻¹ increased it. Other concentrations were not significantly different ($p > 0.05$). In contrast, XYL-B presented important effects in the reduction of DT and ST (Table 3). According to Courtin and Delcour (2001), XYL-F has best activity at the acid conditions (pH 3.5 - 5.0), while XYL-B is better near to neutrality (pH 6.0 - 7.0) and under alkaline conditions. Since in farinograph tests, the sample is not fermented, the pH of the dough is near to neutrality, which justifies the best performance of XYL-B (Bataillon et al. 2000; Polizeli et al. 2005).

Although both fungal and bacterial xylanases hydrolyze the AX backbone in wheat flour, they have different substrate selectivity and behaviors in the flour rheology (Courtin and Delcour 2001; Figueroa-Espinoza et al. 2004). Whereas XYL-B has a preference towards water unextractable arabinoxylan (WU-AX), XYL-F has an affinity to water-extractable arabinoxylan (WE-AX) fraction (Courtin and Delcour 2001; Moers et al. 2005). The best activity of XYL-B

compared to XYL-F in all of the evaluated parameters can be explained because the wheat flour is composed by 2 – 3 % arabinoxylans, and the major part is WU-AX (Goesaert et al. 2007).

Additionally, the lower water absorption caused by the AX depolymerization by xylanases activities, also affected the reduction of the DT and ST by softening dough structure. Ahmad et al. (2013) studied the effects of xylanases on the rheology of wheat flour, obtaining similar results. The authors verified a decrease in the farinographic values by the increasing the enzyme concentration.

At the concentrations of 25 and 150 U.kg⁻¹, XYL-F had a positive effect on W value and P/L ratio. However, XYL-F, in concentrations higher than 250 U.kg⁻¹ and for all concentrations of XYL-B, reduced the alveographic parameters compared to the control. For alveographic tests, the XYL-B effects were more pronounced than XYL-F, similarly as occurred for the farinographic tests. The reduction of the P/L ratio indicates a decrease of the tenacity and an increase on extensibility, due to the break of the AX and the softening of the dough, consequently also reducing the energy deformation value (W).

The tenacity reduction (P/L ratio) promoted an improvement in the W value, which is the main objective to use of the xylanases. According to our results, is necessary a minimal concentration of both xylanases (25 U.kg⁻¹) when used individually, to promoted a beneficial effects in the most rheology parameters with minimal prejudicial interferences in the remaining sets.

3.2.3. Effects of oxidoreductases concentration

Oxidative enzymes, such as glucose oxidase (GOX) and laccase (LAC) have high potential to industry as bread improvers. GOX catalyzes the oxidation of glucose to gluconic acid and hydrogen peroxide, promoting inter and intramolecular disulphide linkages in the gluten network and the gelation of WE-AX (Joye et al. 2009). LAC catalyzes the polymerization of feruloylated arabinoxylans by dimerization of their ferulic esters and oxide the sulfhydryl groups of wheat flour, resulting in disulphide bonds (Minussi et al. 2002; Selinheimo et al. 2007).

As can be seen on Table 4, GOX presented positive effects on water absorption at 250, 583 and 833 U.kg⁻¹, without statistical difference ($p > 0.05$) among them. At these concentrations, GOX increased the WA from 57.1% (control) to around 58.1 %, while at 333 U.kg⁻¹ caused an undesirable decrease in this parameter. Bonet et al. (2006) and Steffolani et al. (2010), found that the addition of GOX did not significantly modified the WA and promoted

an increase in dough stability, while Rocchia et al. (2012) found an increase in water absorption proportional to the increase of the GOX concentration.

Table 4: Concentration effects of glucose oxidase and laccase on rheological parameters of flour.

Enzyme	Enzyme concentration (U.kg ⁻¹ flour)	FN (s)	Farinographic parameters			Alveographic parameters	
			WA (%)	DT (min)	ST (min)	W (10 ⁻⁴ J)	P/L
GOX	0	420 a	57.1 a	12.1 cd	22.8 c	221 c	1.31 f
	25	407 d	57.2 a	13.8 bc	20.1 d	255 a	1.32 f
	150	411 c	57.7 a	17.1 a	27.0 a	207 e	1.94 e
	250	407 d	58.1 a	16.8 a	23.2 bc	216 d	2.33 d
	333	415 b	56.8 a	17.1 a	25.1 ab	189 f	2.85 c
	583	408 d	58.1 a	14.6 b	20.1 d	187 f	5.0 a
	833	409 cd	58.3 a	11.0 d	15.6 e	224 b	4.44 b
	LAC	0	420 c	57.1 c	12.1 f	22.8 e	221 f
LAC	25	411 e	58.8 a	17.7 a	26.8 a	253 d	1.37 c
LAC	150	415 d	58.4 b	16.2 e	24.7 b	244 e	1.72 b
LAC	250	431 a	58.4 b	16.3 de	24.4 c	262 b	1.59 bc
LAC	333	412 e	58.3 b	16.8 c	19.0 f	243 e	1.86 b
LAC	583	424 b	58.2 b	17.2 b	23.3 d	268 a	1.72 b
LAC	833	415 d	58.2 b	16.5 d	24.7 b	258 c	2.35 a

* Same letters in the same column, for each enzyme, are statistically equal by Tukey's test ($p < 0.05$).

GOX also increased the DT until 583 U.kg⁻¹ followed by a good improvement on stability time from 150 to 333 U.kg⁻¹. This is in agreement with Steffolani et al. (2010) and Rocchia et al. (2012), where the addition of GOX promoted an increase on stability time at the highest enzyme concentrations. The most important effect for GOX was on P/L ratio, which increased with the enzyme concentration. This indicates a strengthening of the dough by increasing the tenacity in detriment of the extensibility, which has been related by the formation of additional protein crosslinks via disulfide linkages (Degrand et al. 2015). This strengthening of the dough was also observed by the W value, where with the increase in the enzyme concentration, it was a reduction in the W value, except at 25 U.kg⁻¹, when the concentration of GOX was not enough to rigidify the gluten network.

Laccase is a multi-copper enzyme that catalyzes a variety of aromatic and non-aromatic compounds, with concomitant reduction of molecular oxygen to water (Claus 2004; Selinheimo et al. 2006). In baking, LAC has a strengthening effect that is mainly due to the crosslinking of the esterified ferulic acid on the arabinoxylan (AX) fraction of wheat dough resulting in a strong AX network (Labat et al. 2001). LAC can also oxidize the amino acids, tyrosine and cysteine, to catalyze peptide polymerization, and to crosslink certain proteins, promoting an S-S network (Mattinen et al. 2006; Selinheimo et al. 2008).

Laccase promoted an increase in all parameters evaluated. For the tested LAC concentrations, there were not statistical differences on water absorption ($p > 0.05$), but its addition increased the WA 2.25 % compared to control, from 57.1 % to 58.4 %. LAC addition increased 38 % the development time, from 12.1 (control) to around 16.7 min. For dough stability, there was an improvement from 22.8 to 26.8 min at 25 U.kg⁻¹, while at 333 U.kg⁻¹ it decreased to 19 min. All others concentrations did not show significant differences to the control.

The W (10⁻⁴ J) value and the P/L ratio increased with all LAC concentrations in relation to the control. The P/L ratio varied from 1.37 using 25 U.kg⁻¹, to 2.35 using 833 U.kg⁻¹. It is known that certain increase in the W value could be good, although for LAC, there was an increase in the P/L ratio, which is not good to bread making, being an indicative of excessive oxidation of the flour proteins. A high value of P/L ratio results in low volume breads, because the produced gas by fermentation is not strong enough to compete with the dough tenacity. Additionally, Selinheimo et al. (2007) found that laccase-added doughs were harder and less extensible, and the effects increased in function of the enzyme concentration.

Thus, the addition of 25 U.kg⁻¹ of LAC had significant difference than the control and promoted good improvements in the stability time and W value, being an interesting alternative to correction of weak flours, as an oxidizing agent.

3.2.4. Effects of lipase and transglutaminase concentration

Lipases act hydrolyzing the lipids of the wheat flour releasing fatty acids, mainly mono and diglycerides that have good emulsifiers properties (Gerits et al. 2014b). Wheat flours usually have from 2.0 to 2.5 % of lipids that have been subdivided into starch lipids (40 %), which are located within the starch granule, and non-starch lipids (60 %). According to Gerits et al. (2014a), during mixing, part of the free lipid fraction is transferred to the bound lipid fraction (lipid binding) interacting with the gluten network, due to their amphiphilic nature and ionic interactions. These lipids promote a gluten aggregation by decreasing the electrostatic

repulsion between the gluten polymers. The same authors suggested that the polar lipids stabilize the gas cell on the dough by the interactions with the gluten proteins, stabilizing also the gluten network of the dough, characterizing an emulsifier effect.

As can be seen in Table 5, LIP did not present any significant effect on FN, water absorption and P/L ratio ($p > 0.05$), excepting at 25 and 833 U.kg⁻¹ that enhanced the P/L ratio. The development time was undesirable increased at 333 U.kg⁻¹ and 833 U.kg⁻¹, from 12.1 (control) to 14.6 and 16.8 min, respectively. On the other hand, all other LIP concentrations decreased the development time, where at 150 U.kg⁻¹ it was observed the highest reduction from 12.1 to 5.3 min, but with low interference on stability time, which decreased from 22.8 to 21.9 min. Furthermore, there was a significant improvement ($p < 0.05$) on W (10⁻⁴ J) value, from 221 (control) to 247, without affecting the P/L ratio, that changed from 1.31 to 1.22.

Table 5: Concentration effects of lipase and transglutaminase on rheological parameters of flour.

Enzyme	Enzyme concentration (U.kg ⁻¹ flour)	FN (s)	Farinographic parameters			Alveographic parameters	
			WA (%)	DT (min)	ST (min)	W (10 ⁻⁴ J)	P/L
LIP	0	420 a	57.1 a	12.1c	22.8 c	221 f	1.31 b
	25	411 a	56.9 a	6.4 f	20.2 e	223 f	1.52 a
	150	415 a	57.4 a	5.3 g	21.9 d	247 b	1.18 b
	250	431 a	57.4 a	7.0 e	16.5 g	249 ab	1.22 b
	333	412 a	57.1 a	14.6 b	23.3 b	244 c	1.28 b
	583	424 a	57.3 a	9.2 d	19.1 f	240 e	1.23 b
	833	415 a	56.9 a	16.8 a	25.1 a	251 a	1.64 a
	TG	0	420 a	57.1 a	12.1 b	22.8 f	221 f
25		424 a	57.1 a	17.7 a	29.2 a	266 c	1.20 a
150		425 a	56.9 a	16.9 a	28.0 b	290 b	1.24 a
250		424 a	56.9 a	16.1 a	27.1 c	268 c	1.24 a
333		433 a	57.8 a	16.5 a	23.3 e	262 d	1.22 a
583		422 a	56.8 a	16.8 a	23.5 e	257 e	1.21 a
833		418 a	57.6 a	16.7 a	25.6 d	302 a	1.26 a

* Same letters in the same column, for each enzyme, are statistically equal by Tukey's test ($p < 0.05$).

According to Pareyt et al. (2011), the binding of free lipids with gluten proteins at the interface of gas cells provides suitable elasticity and extensibility and decreasing stickiness. This effect offers resistance and malleability to the dough, allowing greater expansion of the bubble in the alveographic tests, justifying the good improvement in the W value.

Thus, LIP, at a concentration of 150 U.kg^{-1} , was able to promote a desirable decrease in the development time and an important enhancement in the W value, with minimal interferences in the other rheological parameters.

As well as for lipase, transglutaminase (TG) did not present any effects on FN, water absorption, and P/L ratio compared to control ($p > 0.05$). The addition of TG increased 38 % the development time, rising from 12.1 min (control) to 16.7 min, but there are no statistical differences between all the tested concentrations ($p > 0.05$). For stability time, except for 333 and 583 U.kg^{-1} , all studied concentrations were better than the control. The concentrations from 25 to 250 U.kg^{-1} were statistically equal ($p > 0.05$) and provided an increased from 22.8 min (control) to around 28 min. According to Steffolani et al. (2010), TG catalyzes acyl-transfer reactions, introducing covalent crosslinks in proteins between lysine residues and glutamine residues to form an ϵ -(γ -Glu)Lys bonds, strengthening the dough and improving its stability. Moreover, for W values, all concentrations were statistically different ($p < 0.05$) and better than the control, similarly to found by Steffolani et al. (2010). Moreover, the concentrations of 150 and 833 U.kg^{-1} provided an increased from $221 \times 10^{-4} \text{ J}$ to 290×10^{-4} and $302 \times 10^{-4} \text{ J}$, respectively, without significant effects on P/L ratio.

Although, at 25 U.kg^{-1} TG promoted good results on flour rheology, considering its individually effects and its high costs compared to the other studied enzymes, its use in correction of flours to baking is not justified. Moreover, GOX promoted similar effects at low concentrations and, usually, at lowest prices. More studies would be necessary considering its use in association with other enzymes, as identification of the possible cooperative effects.

3.3. Ideal enzymes concentrations measured compared to the manufacturers recommendations

Table 6 presents the comparison between the results obtained by the present work, based on the effects of each enzyme in the flour rheological parameters and the recommendation dosages from the enzyme suppliers. Considering the FN, only AMY-B was able to set this parameter in the concentration range recommended by the supplier, while for AMY-F and AMY-M, it was required a concentration much higher than that specified by the manufacturer. Therefore, just following the manufactures recommendations, without the knowledge of the

flour characteristics and the behavior of each amylase employed in the flour correction, it is not possible to ensure the standardization of the FN.

Table 6: Comparison between ideal studied concentrations and supplier dosage recommended to each enzyme.

Enzyme	Measured ideal concentration		Dosage recommended by the suppliers
	U.kg ⁻¹	ppm	ppm
AMY-F	583	243	10 – 20
AMY-B	150	83	50 – 150
AMY-M	583	280	10 – 100
XYL-F	25	11	30 – 50
XYL-B	25	12	20 – 50
GOX	25	10	2 – 50
LAC	25	96	Not declared
LIP	150	26	5 – 50
TG	25	18	10 - 30

The concentrations required to FN adjust by AMY-F and AMY-M, are economically unfeasible because at high concentrations, the costs do not justify its use in industry. Considering that, individually, AMY-B was able to correct the FN at a low concentration, more studies are required to verify possible effects of cooperation, when the three amylases are used together.

For xylanases, with a concentration much lower than the recommended by the manufacturers, it was possible to improve the flour rheology, mainly by reducing the tenacity, by the increase of W and the P/L ratio. Thus, the use of concentrations suggested by the suppliers could lead to the use of excessive dosages, being necessary to know previously the characteristics of the flour and how the xylanases will affect them.

The dosage range suggested by suppliers to GOX is very ample to ensure functionality in several types of flour. Therefore, for strong flours, such as the used in the present study, low concentrations were enough to obtain good improvements. Moreover, the flour rheological parameters were sensible to GOX concentration, and excessive dosages could be more prejudicial than beneficial, as showed in Table 4. LAC it is not a usual enzyme employed to baking flour correction. However, even at a low concentration, LAC proved to be a good

alternative, as well as GOX, to substitute the chemical oxidants, mainly by its strengthening effects, evidenced by the improvement on stability time and W value.

LIP showed interesting effects on flour rheology, mainly by the improvements on W value and P/L ratio. The LIP concentrations employed depend largely of the wheat lipid composition. Thus, the decision about the lipase concentration should always consider its impact on flour rheology, mainly in DT reduction and improvement of W value, independent of the recommendations of the suppliers.

According to the effects presented in this work, the use of TG for flour correction, it is not recommended, since TG is an expensive enzyme. To flour strengthening, GOX and LAC showed to be a better alternative than TG.

4. CONCLUSION

Wheat flours used to baking generally require a correction of α -amylase activity for adjustment to baking process. However, this adjustment resulted in changes on other rheological parameters that imply in the quality of flour and its bread making potential. Different enzymes act on different wheat flour fractions, according to their individual mechanisms, affecting in different ways the rheological properties of wheat flour.

Based on the present work, it can be concluded that the reduction in the development time and a P/L ratio (suitable for baking) promoted by XYL-B and LIP effects, confirm their potential to use in the correction of flours for baking. The increase of the stability time and W value, achieved by the use of GOX and LAC, shows that these enzymes could be good alternatives to adjust the rheological parameters after the FN correction by α -amylase. Furthermore, it was also observed that knowing the effect of each enzyme on flour rheology, it is important to use them in lower concentrations to those specified by the manufacturers. Moreover, further studies using these enzymes in combination should be performed in order to identify the cooperatives and antagonists interactions between the enzymes when used together, to substitution of oxidant agents, as azodicarbonamide.

Aknowledgements

This work was supported by scholarships (MM Bueno) from CAPES/FAPERGS. The authors wish specially thank to Tondo S.A. (Forqueta, Brazil) for kindly supplying the raw material and its laboratory for rheological analysis, as well as AB Enzymes, Granolab S.A., Novozymes and Vallens Food Ingredients for supplying the enzymes used in this research.

REFERENCES

- AACC (2000) *Approved Methods of Analysis*, vol 1-2. 10 edn. St. Paul, MN, USA.: American Association of Cereal Chemists.
- AACC (2005) Mill Process Control. In: Wheat Flour Milling. References Series. (pp. 397-418). AACC International, Inc.
- AACC (2009) *Approved Methods of Analysis*. 11 edn. St. Paul, MN, USA.: American Association of Cereal Chemists.
- Ahmad Z, Butt MS, Ahmed A & Khalid N (2013) Xylanolytic Modification in Wheat Flour and its Effect on Dough Rheological Characteristics and Bread Quality Attributes. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 56(6), 723-729.
- Bailey MJ, Biely P & Poutanen K (1992) Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*. 23(3), 257-270.
- Barrera GN, León AE & Ribotta PD (2015) Use of enzymes to minimize the rheological dough problems caused by high levels of damaged starch in starch-gluten systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. In Press, 10.1002/jsfa.7374.
- Bataillon M, Cardinali APN, Castillon N & Duchiron F (2000) Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus* sp strain SPS-0. *Enzyme and Microbial Technology*. 26(2-4), 187-192.
- Bernfeld P (1955) Amylase, α and β . In: *Methods in Enzymology*, vol 1. (pp. 149-158). Academic Press.
- Bonet A, Rosell CM, Caballero PA, Gómez M, Pérez-Munuera I & Lluch MA (2006) Glucose oxidase effect on dough rheology and bread quality: A study from macroscopic to molecular level. *Food Chemistry*. 99(2), 408-415.
- Caballero PA, Bonet A, Rosell CM & Gomez M (2005) Effect of microbial transglutaminase on the rheological and thermal properties of insect damaged wheat flour. *Journal of Cereal Science*. 42(1), 93-100.
- Caballero PA, Gómez M & Rosell CM (2007) Improvement of dough rheology, bread quality and bread shelf-life by enzymes combination. *Journal of Food Engineering*. 81(1), 42-53.
- Cauvain SP & Young LS (2006) The Chorleywood bread process.
- Cauvain SP & Young LS (2007) *Technology of Breadmaking*, vol 1. 2 edn. New York, USA: Springer.
- Ciucu A & Patroescu C (1984) Fast Spectrometric Method of Determining the Activity of Glucose Oxidase. *Analytical Letters*. 17(12), 1417-1427.
- Claus H (2004) Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*. 35(1-2), 93-96.
- Collar C & Bollain C (2005) Impact of microbial transglutaminase on the staling behaviour of enzyme-supplemented pan breads. *European Food Research and Technology*. 221(3-4), 298-304.
- Courtin CM & Delcour JA (2001) Relative Activity of Endoxylanases Towards Water-extractable and Water-unextractable Arabinoxylan. *Journal of Cereal Science*. 33(3), 301-312.
- Csáki KF (2011) Synthetic surfactant food additives can cause intestinal barrier dysfunction. *Medical Hypotheses*. 76(5), 676-681.
- Degrand L, Rakotozafy L & Nicolas J (2015) Activity of carbohydrate oxidases as influenced by wheat flour dough components. *Food Chemistry*. 181, 333-338.
- Dunnewind B, Van Vliet T & Orsel R (2002) Effect of oxidative enzymes on bulk rheological properties of wheat flour doughs. *Journal of Cereal Science*. 36(3), 357-366.

- Figuerola-Espinoza MC, Poulsen C, Soe JB, Zargahi MR & Rouau X (2004) Enzymatic solubilization of arabinoxylans from native, extruded, and high-shear-treated rye bran by different endo-xylanases and other hydrolyzing enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(13), 4240-4249.
- Garcia TA (2006) Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus*. Doutorado em Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília - Instituto de Ciências Biológicas, Brasília - DF.
- Gerits LR, Pareyt B, Decamps K & Delcour JA (2014a) Lipases and Their Functionality in the Production of Wheat-Based Food Systems. *CRF3 Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 13(5), 978-989.
- Gerits LR, Pareyt B & Delcour JA (2014b) A lipase based approach for studying the role of wheat lipids in bread making. *Food Chemistry*. 156, 190-196.
- Goesaert H, Bijttebier A & Delcour JA (2010) Hydrolysis of amylopectin by amylolytic enzymes: level of inner chain attack as an important analytical differentiation criterion. *Carbohydrate Research*. 345(3), 397-401.
- Goesaert H, Gebruers K, Courtin CM, Brijs K & Delcour JA (2007) Enzymes in Breadmaking. In: *Bakery Products: Science and Technology*. (pp. 337-364).
- Goesaert H, Leman P, Bijttebier A & Delcour JA (2009a) Antifirming Effects of Starch Degrading Enzymes in Bread Crumb. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(6), 2346-2355.
- Goesaert H, Slade L, Levine H & Delcour JA (2009b) Amylases and bread firming - an integrated view. *Journal of Cereal Science*. 50(3), 345-352.
- Grossowicz N, Wainfan E, Borek E & Waelsch H (1950) The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. *Journal of Biological Chemistry*. 187(1), 111-125.
- Hu X, Li Z, Yao J, Yu M, Yu X & Yao X (2012) Antistaling agent used for whitening and maintaining freshness of steamed bread, comprises lipase, amylase, xylanase and maltogenic amylase. CN103371426-A.
- Joye IJ, Lagrain B & Delcour JA (2009) Use of chemical redox agents and exogenous enzymes to modify the protein network during breadmaking - A review. *Journal of Cereal Science*. 50(1), 11-21.
- Labat E, Morel MH & Rouau X (2001) Effect of laccase and manganese peroxidase on wheat gluten and pentosans during mixing. *Food Hydrocolloids*. 15(1), 47-52.
- Leman P, Goesaert H, Vandeputte GE, Lagrain B & Delcour JA (2005) Maltogenic amylase has a non-typical impact on the molecular and rheological properties of starch. *Carbohydrate Polymers*. 62(3), 205-213.
- Leonowicz A & Grzywnowicz K (1981) Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. *Enzyme and Microbial Technology*. 3(1), 55-58.
- Lerner A & Matthias T (2015) Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*. 14(6), 479-489.
- Mattinen ML, Hellman M, Permi P, Autio K, Kalkkinen N & Buchert J (2006) Effect of protein structure on laccase-catalyzed protein oligomerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(23), 8883-8890.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31, 426-428.
- Minussi RC, Pastore GM & Durán N (2002) Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*. 13(6-7), 205-216.

- Moers K, Celus I, Brijs K, Courtin CM & Delcour JA (2005) Endoxylanase substrate selectivity determines degradation of wheat water-extractable and water-unextractable arabinoxylan. *Carbohydrate Research*. 340(7), 1319-1327.
- Noonan GO, Begley TH & Diachenko GW (2008) Semicarbazide formation in flour and bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(6), 2064-2067.
- Palma MB (2003) Xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using solid state cultivation (Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido). Doctoral Thesis, Chemical Engineering, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.
- Pareyt B, Finnie SM, Putseys JA & Delcour JA (2011) Lipids in bread making: Sources, interactions, and impact on bread quality. *Journal of Cereal Science*. 54(3), 266-279.
- Pizzinatto A, Magno CPRS & Campagnolli DMF (2004) *Avaliação e controle de qualidade da farinha de trigo*. Campinas: ITAL.
- Polizeli M, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA & Amorim DS (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67(5), 577-591.
- Roberts CL, Rushworth SL, Richman E & Rhodes JM (2013) Hypothesis: Increased consumption of emulsifiers as an explanation for the rising incidence of Crohn's disease. *Journal of Crohn's and Colitis*. 7(4), 338-341.
- Roccia P, Ribotta PD, Ferrero C, Perez GT & Leon AE (2012) Enzymes action on wheat-soy dough properties and bread quality. *Food and Bioprocess Technology*. 5(4), 1255-1264.
- Santos IJd, Santos YLd, Oliveira MGdA & Silva PHA (2010) Expressão da alfa e beta amilase durante a germinação de cevada. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 12, 67 - 73.
- Selinheimo E, Autio K, Krijus K & Buchert J (2007) Elucidating the mechanism of laccase and tyrosinase in wheat bread making. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(15), 6357-6365.
- Selinheimo E, Kruus K, Buchert J, Hopia A & Autio K (2006) Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science*. 43(2), 152-159.
- Selinheimo E, Lampila P, Mattinen ML & Buchert J (2008) Formation of protein-oligosaccharide conjugates by laccase and tyrosinase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(9), 3118-3128.
- Soares C, De Castro H, Moraes F & Zanin G (1999) Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 79(1-3), 1-3.
- Souza CFV, Rodrigues RC, Heck JX & Ayub MAZ (2008) Optimization of transglutaminase extraction produced by *Bacillus circulans* BL32 on solid-state cultivation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 83(9), 1306 - 1313.
- Steffolani ME, D. P, Pérez GT & León AE (2010) Effect of glucose oxidase, transglutaminase, and pentosanase on wheat proteins: Relationship with dough properties and bread-making quality. *Journal of Cereal Science*. 51(3), 366-373.
- Van der Maarel MJ, Van der Veen B, Uitdehaag JC, Leemhuis H & Dijkhuizen L (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *Journal of Biotechnology*. 94(2), 137-155.
- Ye J, Wang XH, Sang YX & Liu Q (2011) Assessment of the determination of azodicarbonamide and its decomposition product semicarbazide: Investigation of variation in flour and flour products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(17), 9313-9318.

CAPÍTULO IV – ARTIGO 2

Microbial enzymes as substitutes of chemical additives in baking wheat flour – Part II: Combined effects of nine enzymes on flour dough rheology

Neste trabalho foram estudados os efeitos da adição combinada de 9 enzimas comerciais nos parâmetros reológicos de uma farinha de trigo padrão para panificação e uma farinha fraca para confeitaria, a fim de se identificar efeitos de cooperação ou de oposição entre elas. As variáveis foram avaliadas através de Planejamento Plackett-Burman 11/12 com 3 repetições no ponto central, tendo como resposta a influência da presença de cada uma delas nos parâmetros reológicos das farinhas A e B. As enzimas que apresentaram efeitos benéficos nas propriedades reológicas das farinhas foram otimizadas através de Planejamento Fatorial 2³ completo, cujas concentrações ótimas foram identificadas e comparadas com os efeitos proporcionados por um oxidante químico na reologia das massas de cada amostra de farinha. Os resultados estão apresentados no artigo que segue, submetido à publicação no *Food and Bioprocess Technology: An International Journal*.

Microbial enzymes as substitutes of chemical additives in baking wheat flour – Part II: Combined effects of nine enzymes on dough rheology

Micheli Maria Bueno^a, Roberta Cruz Silveira Thys^b, Rafael C. Rodrigues^{a*}

^aBiotechnology, Bioprocess and Biocatalysis Group, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

^bBaking Laboratory, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author:

Tel.: +55 51 3308 7793; fax: +55 51 3308 7048

E-mail address: rafaelcrodrigues@ufrgs.br (R. C. Rodrigues) - www.ufrgs.br/bbb

ABSTRACT

In this work, the combined effects of nine commercial enzymes were studied on the rheological properties of dough wheat flour. Fungal (AMY-F), bacterial (AMY-B) and maltogenic (AMY-M) α -amylases, fungal (XYL-F) and bacterial (XYL-B) xylanases, glucose oxidase (GOX), laccase (LAC), lipase (LIP) and transglutaminase (TG) were tested in two types of flour: standard strong flour (flour A); and common weak flour (flour B). Falling Number (FN), farinography and alveography analysis were carried out through two sequential experimental designs, aiming to identify synergistic and antagonist effects between the enzymes and the optimal concentration of each one as substitutes of chemical additives. For flour A, the best combination of enzymes was AMY-B (166 U.kg⁻¹), AMY-M (133 U.kg⁻¹), XYL-B (150 U.kg⁻¹), GOX (8 U.kg⁻¹) and LIP (150 U.kg⁻¹). It was identified a synergistic effect between XYL-B and GOX to improvement of W value (10⁻⁴ J) and the P/L ratio. For flour B, the best combination of enzymes was AMY-B (150 U.kg⁻¹), LIP (150 U.kg⁻¹), GOX (100 U.kg⁻¹) and LAC (200 U.kg⁻¹). GOX and LAC presented a cooperative effect, when they were used at opposite concentrations. The enzymes mixtures were compared with chemical oxidant azodicarbonamide, and, even at the maximum concentration allowed by Brazilian Health Surveillance Agency, the enzyme mixture was more effective. It was demonstrated that it is possible to perform the complete substitution of chemical oxidants by enzymes in order to adequate and improve the rheological parameters of dough wheat flours, even for a weak flour, making it suitable for bakery.

Keywords: enzymes; wheat flour; rheology; dough; combined effects; chemical additives.

1. INTRODUCTION

Industrial wheat flours should have specific rheological properties that will ensure the quality of the final products. These rheological characteristics are subject to a number of factors, ranging from climatic factors and cultivation, to manufacturing procedures such as storage and milling (Dunnwind et al. 2002). However, raw materials with suitable quality features are not always available, making impossible to obtain flour with the desired characteristics, only by milling and classification techniques. Thus, in order to overcome these limitations, mills often employ auxiliary components to improve or correct the quality variations in industrial flours (Cauvain and Young 2007), for example azodicarbonamide (ADA) and enzymes preparations.

ADA is a synthetic oxidizing agent that quickly oxidizes the S-H groups of glutenin by the formation of S-S groups, more stable and less reactive. For decades, it was used as a flour improver by its strengthening effect on the gluten network, producing doughs more strong and elastic. Nowadays, the baking industry searches for alternatives to its use, mainly because ADA is linked to a high-level of allergies and diseases, and its use have been banned in many countries (Lerner and Matthias 2015; Noonan et al. 2008; Stadler et al. 2004; Ye et al. 2011).

On the other hand, treatments with enzymes have been, in general, preferred to the addition of chemical improvers since they are natural, highly specific and completely safe to health. Furthermore, enzymes do not remain active in the final product and, therefore, do not have to appear on the label (Caballero et al. 2007). Among the enzymes intended for flour treatment, it can be highlighted those belonging to the class of hydrolases, mainly α -amylases, xylanase and lipases; the oxidoreductases such as glucose oxidase and laccase; and transglutaminase belonging to the class of transferases (Bonet et al. 2006; Gerits et al. 2014; Goesaert et al. 2007; Joye et al. 2009; Minussi et al. 2002; Renzetti et al. 2010; Steffolani et al. 2010).

Commercial enzymatic preparations, used in baking flour formulations or flour treatments, have typically a mixture of these enzymes that acts in different fractions of flour aiming beneficial effects on rheology, such as correction of α -amylase activity, improvement of machinability parameters or strengthening of dough (Barrera et al. 2015). However, when used together, they do not have always the same standard behavior as for their individual performance. Often, recommendations for use of these blends are based on the individual effect of each enzyme, without consider possible synergistic or antagonistic effects. Moreover, the main difficult for using this wide range of enzymes on flour correction, is still the limited knowledge about their combined effects, because the published studies usually evaluate two

enzymes at a time or, as much, a combination of four enzymes (Buche et al. 2011; Caballero et al. 2007; Figueroa-Espinoza et al. 2004; Primo-Martín and Martínez-Anaya 2003; Renzetti and Arendt 2009; Steffolani et al. 2010).

Additionally, the behavior of the enzymes is not same for different types of flours. Standardized and strong baking flour requires different treatment than weak flour. Thus, this comprehension is important to know which enzymes can be used for industrial flour correction as well as the knowledge of how they affect on dough rheology, providing a process optimization of the intended products. Moreover, the most important improvement that is expected by the enzymatic addition is the possibility to obtain flour with industrial baking characteristics, from low quality and weak wheat flours.

Therefore, based in this lack of knowledge of combined effects of enzymes on dough rheology, the aim of this work was to evaluate the effects of nine baking enzymes when used in combination, on rheology parameters of two wheat flours, one strong baking flour and one biscuit weak flour. Firstly, the 9 enzymes were studied in combination for both types of flour using a Plackett-Burman design. Then, the most important enzymes for each flour were selected, based on their beneficial effects on the rheological properties of each flour dough. Their concentrations were optimized using a full factorial design. Finally, each mixture of enzyme for each flour was compared to chemical additives, proposing a full substitution of chemical additives by enzymes. In all cases the falling number and farinographic and alveographic analysis were performed.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Material

2.1.1. Enzymes

The enzymes were kindly provided by suppliers listed below and were selected under the condition of being pure, i.e., without being mixed or complexed with other enzyme. For comparative purposes, enzymatic activities were determined and expressed as U.g⁻¹ of commercial preparation.

The following enzymes were tested: fungal α -amylase Veron M4 from *Aspergillus oryzae* (AB Enzymes); bacterial α -amylase Spring Alfa Bac 7500 from *Bacillus amyloliquefaciens* (Granolab); maltogenic α -amylase Veron Mac from *Bacillus stearothersophilus* (AB Enzymes); fungal xylanase Veron 191 S from *Aspergillus niger* (AB Enzymes); bacterial xylanase Veron RL from *Bacillus subtilis* (AB Enzymes); glucose oxidase

Spring Gluz from *Bacillus subtilis* (Granolab); laccase Novoprime Base 268 from *Aspergillus oryzae* (Novozymes); lipase Enzymill FL from *Humicola spp* (Vallens Food Ingredients) and transglutaminase Veron TG from *Streptoverticilium mobarense* (AB Enzymes).

2.1.2. Wheat flours

The flour samples were provided by Tondo S.A. (Forqueta, RS) without previous bleaching and chemical or enzyme additives. The flours were stored (at 25 °C and 70% of relative humidity) before use to stabilize the naturally maturing process. Two types of flour were studied: one flour composed by a mix of the Brazilian (50 %), American (10 %) and Argentinian (40 %) wheat; with an extraction of 70 % and classified as Type 1, commercially designed for baking, and named as Flour A. The second, it was low-quality flour, totally composed by Brazilian wheat, with 40 % of extraction and classified as Type 2, commercially designed for correction of flour extraction or biscuits production, named as Flour B.

The specifications of both flours, A and B, were, respectively: moisture (13.30 and 13.60 %); Ash – dry weight (0.48 and 0.82 %); Falling Number (420 and 343 s); Gluten – dry weight (8.5 and 9.9 %); Gluten index (98.80 and 76.90); Colour – L*, a*, b* (91.95, -0.53, 10.70 and 90.95, -0.37, 11.32). The farinographic parameters to flours A and B were, respectively: Water absorption (57.10 and 59.70%); Development time (12.10 and 7.20 min); Stability time (22.80 and 11.90 min). The alveographic parameters to flours A and B were, respectively: W - Deformation energy (221 and 182 x10⁻⁴ J) and Curve configuration P/L ratio (1.31 and 0.77).

2.2. Methods

2.2.1. Enzyme activities

In order to easily compare the enzymes, all enzymatic preparations were characterized for their enzymatic activities by standard methods described by Bueno et al. (Submitted). The activity for each enzyme was: Fungal α -amylase (AMY-F, 2400 U.g⁻¹); Bacterial α -amylase (AMY-B, 1800 U.g⁻¹); Maltogenic α -amylase (AMY-M, 2079 U.g⁻¹); Fungal xylanase (XYL-F, 2194 U.g⁻¹); Bacterial xylanase (XYL-B, 2077 U.g⁻¹); Glucose oxidase (GOX, 2376 U.g⁻¹); Laccase (LAC, 260 U.g⁻¹); Lipase (LIP, 5700 U.g⁻¹); Transglutaminase (TG, 1400 U.g⁻¹).

2.2.2. Physical-chemical analysis

Moisture was measured by Near-Infrared Spectral Reflectance (NIR), method 44-15.02 (AACC 2009) in an infrared micro-analyzer Gehaka IV 200 (Gehaka, Brazil). Gluten content and gluten index were determined by extracting gluten proteins, following the official methods, 38-12.01 e 38-12.02 (AACC 2009), respectively, using the Glutomatic System equipment (Perten, Sweden). Ash content was determined by incineration, method 08-01.01 (AACC 2009). The color was determined by CIELAB scale, using a Colorimeter Minolta CR 310, method 14-22.01 (AACC 2000).

2.2.3. Rheological analysis

The α -amylase activity was determined according to official Hagberg Falling Number by the method 56–81.03 (AACC 2009). Farinographic assays were performed in farinograph Brabender (Brabender Instruments, Inc., Germany) following the official method 54-21.02 (AACC 2009). It was studied the following parameters: flour water absorption (%), dough development time (min) and dough stability time (min). The alveographic assays were carried out in an Alveograph NG Alveolink (Chopin Technologies, France) following the official method 54-30.02 (AACC 2009), measuring the deformation energy W ($\times 10^{-4}$ J), dough tenacity P , dough extensibility L and their balance P/L ratio.

2.2.4. Experimental Design

The combined effects of 9 enzymes on dough rheology were studied by a sequence of two experimental designs, for both types of flour, A and B, as described below.

Firstly, it was performed a Plackett-Burman 11/12 experimental design (P-B design) for screening the most important enzymes on dough rheology. P-B design was composed by 2 levels for each variable and 3 repetitions at the central point, where high level (+1) was set at 150 U.kg^{-1} of flour, the low level (-1) corresponded to absence of enzyme, and the central point (0) that it was set at 75 U.kg^{-1} of flour, for all enzymes. These concentrations were based on previous experiments (Bueno et al. Submitted). The matrix of the P-B design with the 15 experiments was presented in Table 1. The variables 1 to 9 represent each enzyme, 10 and 11 are inert variables and were used for calculation of the pure error. The same matrix was used for both flours, A and B, and for each experiment, all rheological parameters were determined.

After selection of the enzymes in the P-B design, the concentration of the selected variables was optimized in a 2^3 full factorial experimental design, with 8 factorial points and 3 repetitions in the central point. The matrices for the factorial design, for each flour sample, were presented

in Tables 2 and 4 for flour A and B, respectively. For flour A, AMY-M (100-166 U.kg⁻¹), XYL-B (100-200 U.kg⁻¹) and GOX (50-150 U.kg⁻¹) were evaluated, while LIP and AMY-B concentrations were fixed at 150 and 166 U.kg⁻¹, respectively. The final adjustment of flour A was carried out in 6 additional experiments varying the concentrations of XYL-B and GOX. For flour B, AMY-B, GOX and LAC varied from 100 to 200 U.kg⁻¹, while LIP concentration was fixed at 150 U.kg⁻¹. In all cases, the rheological parameters were determined

2.2.5. Azodicarbonamide effects on rheological parameters of the flours A and B

Enzymatic treatments results were compared to the chemical oxidant azodicarbonamide (ADA). For flour A, the FN was adjusted by the addition of α -amylase (AMY-B 166 U.kg⁻¹ and AMY-M 133 U.kg⁻¹) and ADA was tested in the concentrations 5 and 10 ppm. For B flour, FN was adjusted by the addition of α -amylase (AMY-B 100 U.kg⁻¹) - previously identified - and ADA was tested at concentrations 10, 20, 30 and 40 ppm (maximum concentration allowed by Brazilian Health Surveillance Agency). For each flour the chemical oxidant was compared to the best enzyme combination.

2.2.6. Statistical Analysis

The experimental design and analysis of results were carried out using the software Statistica 12.0 (Statsoft, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Industrial wheat flours should have specific rheological parameters that will ensure the quality of the final products. If the final use is baking, the following parameters should be set in specific ranges: falling number (FN) around 250 – 320 s, water absorption (WA) around 56 - 57 %, development time (4 - 10 min) and stability time (> 15 min). Additionally, alveographic parameters should range from 200 to 300 (10⁻⁴ J) for W and a P/L ratio above 0.88 (Pizzinatto et al. 2004); values below or above this may result in changes in its functionality and machinability (Cauvain and Young 2006; Pizzinatto et al. 2004).

In a previous study (Bueno et al. Submitted), the individual effect of each enzyme used in the present work was evaluated on the rheological parameters of wheat flour. However, these enzymes are usually used in combination, thus, it is important to know how they will interact with each other and affect the dough rheology. In the present study, the enzymes were tested in combination to verify the synergistic and antagonistic effects between them, and thus to select

those who are important for improvement of dough rheology. This way, the enzymes varied from 0 to 150 U.kg⁻¹, (in 3 levels), in a Plackett-Burman design. The enzymes were tested in two different flours: flour A, which is a strong flour, indicated for baking, and flour B that was a weak flour, indicated for biscuits. The matrix of the P-B design is presented in Table 1, with the respective rheological parameters obtained in each experiment for flours A and B.

Table 1: Matrix for Plackett-Burman experimental design and rheological parameters on flours A and B.

Assay	1 ^a	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	FLOUR A					FLOUR B						
												FN ^b	WA	DT	ST	W	P/L	FN	WA	DT	ST	W	P/L
Standard ranges*												250-320	> 56	4-10	> 15	200-300	> 0.88	250-320	> 56	4-10	> 15	200-300	> 0.88
1^c	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	347	55.5	15.8	23.3	200	1.88	300	57.6	8.7	15.9	176	0.62
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	310	53.6	14.6	26.0	212	1.26	295	57.2	8.8	15.2	160	0.46
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	269	55.1	12.0	21.4	202	0.96	264	58.6	5.0	8.3	169	0.46
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	344	55.3	14.5	29.4	251	1.32	313	57.8	7.4	13.1	192	0.55
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	348	57.0	13.3	23.2	144	1.18	230	57.0	8.1	13.0	155	0.50
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	300	54.8	13.4	19.8	224	1.03	238	57.0	6.0	10.3	171	0.36
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	304	55.6	12.8	21.2	185	2.11	289	57.9	5.1	11.9	197	0.69
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	390	57.3	13.6	19.4	191	1.29	335	59.7	7.8	13.3	179	0.54
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	404	57.6	14.4	30.1	196	1.34	358	60.9	5.9	7.8	195	0.55
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	367	56.1	14.0	19.8	193	1.12	312	58.8	7.2	12.7	188	0.43
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	314	56.3	13.3	26.6	200	2.17	290	58.4	8.0	16.9	191	0.58
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	419	57.1	16.2	24.8	238	1.59	343	59.7	7.2	11.9	182	0.77
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	277	55.8	18.7	24.3	125	2.26	314	57.7	6.7	11.3	161	0.43
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	277	55.6	18.4	24.1	123	2.17	312	57.5	6.4	11.0	163	0.43
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	276	55.7	18.6	24.3	127	2.28	314	57.3	6.6	11.1	160	0.41

* (Cauvain et al. 2006; Pizzinatto et al. 2004)

a) Variables: 1 = AMY-F, 2 = AMY-B, 3 = AMY-M, 4 = XYL-F, 5 = XYL-B, 6 = GOX, 7 = LAC, 8 = LIP, 9 = TG, 10 and 11 was used to pure error calculation.

b) FN: Falling Number; WA: water absorption; DT: development time; ST: stability time; W: deformation energy (10⁻⁴ J) and P/L ratio.

c) Levels: -1 = absence of enzyme; +1 = 150 U.kg⁻¹; 0 = 75 U.kg⁻¹.

3.1.1. Falling Number

All studied enzymes, except LIP, had a statistical significant effect ($p \leq 0.05$) on FN value for flour A. The main effects were from AMY-B, AMY-M, TG and AMY-F, reducing the FN. As the control sample presented high FN value (419 s), this reduction was desirable, because the ideal range to baking use is around 250 – 320 seconds. In spite of the fact that AMY-F presented the same activity than AMY-M when they were used individually (Bueno et al. Submitted), when both are present in the mixture, AMY-M was better than AMY-F. According to Van der Maarel (2002), although maltogenic amylase has some endo-activity, it acts mainly as an “exo-enzyme” in the initial stages of the incubation, hydrolyzing the α -(1–4) glycosidic bonds of the external chain of the starch polymers, releasing almost exclusively α -maltose. Thus, it does not compete for the same starch fraction of the fungal and bacterial amylases that attack internally the starch chain on α -(1–4) glycosidic bonds, releasing mainly glucose and some oligosaccharides with varying lengths and different α -limit dextrins containing α -(1–6) bonds (Goesaert et al. 2009; Leman et al. 2005). However, at high temperatures and longer incubation times, the endo-activity of AMY-M becomes more pronounced. Thus, its multiple attack action allows a better performance than AMY-F during the heating and starch gelatinization.

On the other hand, by the main effects analysis, XYL-F and XYL-B were those enzymes that most affected the FN on an undesirable way, increasing it on flour A. According to Primo-Martin et al. (2003), the water extractable arabinoxylans (WE-AX) hydrolyzed by xylanases, are gelatinized by the oxidative enzymes, as GOX and LAC. Thus, an increase in the viscosity of the suspension, could promote a false increasing effect on FN by xylanases. Arabinoxylans (AX) are non-starch polysaccharides of cereal grain cell wall consisting of a backbone of xylose substituted with arabinose residues. They are divided into water-extractable (WE-AX) and water-unextractable arabinoxylans (WU-AX), which have different physicochemical properties (Courtin and Delcour 2001). WU-AX are retained in the cell wall by covalent and non-covalent interactions with other AX molecules and cell wall constituents such as protein, lignin and cellulose, while WE-AX are loosely bound at the surface of these cell walls (Moers et al. 2005). Oxidative gelation is a unique property of WE-AX by gelation of feruloylated arabinoxylans by dimerization to their ferulic esters, which characterizes an increase in the viscosity of a solution. WU-AX, on the other hand, have strong water holding capacity (Courtin et al. 2001).

For flour B, all enzymes significantly affected ($p \leq 0.05$) the FN; as it was expected, the amylases reduced the FN; as the control sample had high value of FN (343 s), a reduction effect was also desirable. However, contrary to effect observed in the flour A, XYL-F, TG, LIP and GOX affected the FN increasing it, while XYL-B and LAC decreased the FN. Although xylanases attack the AX backbone in a random manner, according to Moers et al. (2005), they differ in preference for both AX populations (WE-AX and WU-AX) and, hence, their substrate selectivity, affecting differently the AX functionality. Thus, bacterial endo-xylanase (from *Bacillus subtilis*), preferentially hydrolyses WU-AX and leaves WE-AX and soluble arabinoxylans (S-AX) intact, beneficially affecting bread loaf volume by softening of the dough, while fungal endo-xylanase (from *Aspergillus* spp.), preferentially hydrolyzes WE-AX and S-AX, improving the gluten agglomeration.

This AX fraction preference by fungal and bacterial xylanases may explain the different behavior in both flour samples. As mentioned before, WU-AX is strongly linked with the cell wall constituents and represent the major fraction of the wheat arabinoxylans. Since flour B has a high percentage of wheat bran, evidenced by the high ash content, consequently, a high content of WU-AX bonded could be used as substrate for XYL-B, leading to a high hydrolytic activity and reducing the FN; while XYL-F kept the same behavior as observed in flour A. Another hypothesis discussed by Berrin and Juge (2008), is that the higher activity towards WU-AX might be explained by the smaller size of the GH11 (*Bacillus subtilis*) xylanase (~20 kDa) than the GH10 (*Aspergillus* spp.) xylanases (~30 kDa), which makes easier the diffusion into the cell wall network in wheat bran.

Most of the studied enzymes could act in cooperation to reduce the FN value, by a “cleaning effect” of the wheat flour structure. As the wheat flour is a complex system, the hydrolyzed of many starch linked constituents, as lipids by lipases and AX by xylanases, or by interaction with the proteins by LAC, GOX and TG, could facilitate the access of these starch fractions to the amylases, which are not fully accessible before by steric hindrances.

3.1.2. Water absorption

According to Cauvain (2007), water absorption (WA) around 56 – 57 % is ideal for flours designed to baking industry; values below or above this, may result in changes in the functionality and machinability of dough during the bread making process. For the water absorption (WA) of flour A, most of the enzymes presented significant effects ($p \leq 0.05$), except

XYL-F, GOX and LIP. All α -amylases and TG decreased the water absorption, while XYL-B and LAC increased it.

As expected, amylases reduced the flour WA capacity by the hydrolysis of starch granule and by the break of α -1–4 linked chains of amylose and amylopectin, releasing α -dextrins (low molecular weight) and water, reducing also the viscosity of the suspension. On the other hand, the arabinoxylans hydrolyzed by xylanases in presence of oxidative enzymes, mainly LAC, can be jellified, presenting high water-binding capacity (Muralikrishna and Nirmala 2005; Renzetti et al. 2010; Selinheimo et al. 2006), which explains their WA increasing effect.

However, the TG behavior was not expected. The water absorption of the wheat flour can be due to interaction with the starch chain, as well as by protein-water interactions. As TG catalyzes the crosslinks (polymerization) between the γ -carboxamide group of a glutamine and the ϵ -amino group of a lysine group, the protein network becomes strength, cohesive, elastic and with a high water binding capacity (Damodaran 2008; De Souza et al. 2008; Gerrard et al. 1998). Nevertheless, when the enzyme concentration reaches at certain point, the WA capacity becomes inversely correlated, because at high enzyme concentrations, an excessive number of inter and intra peptide chain cross-links are formed, resulting in a strong protein network and reducing the protein-water interactions (Han et al. 2008; Min and Green 2008). Steffolani et al. (2010) and Caballero et al. (2007) did not observe any significant effects on WA of a baking wheat flour using different concentrations and enzymes combinations. Thus, the unexpected TG effect on flour A may have been caused by an excessive dosage of the enzyme or by interacting with other enzymes, which further studies would be necessary to better assess this possibility.

To flour B, only AMY-F, AMY-B, AMY-M, LAC and XYL-B presented significant effects ($p \leq 0.05$) on WA. All α -amylases decreased the water absorption, while XYL-B increased it, as already expected and discussed earlier for flour A. However, LAC presented a positive effect, increasing WA. This effect is probably due to the ability to gelling the AX network promoted by LAC, but since this effect was not observed when it was used individually (Bueno et al. Submitted), further studies are necessary to understand under what conditions the effect of LAC is reversed or suppressed.

3.1.3. Development time

For development time (DT), TG and XYL-F did not present significant effects ($p \geq 0.05$) for flour A, contrary to observed when they were used individually at the same concentrations (150 U.kg^{-1}) (Bueno et al. Submitted). LIP and AMY-F are other two enzymes that presented different effects than to when used individually. In combination with other enzymes, LIP and AMY-F increased the DT. On the other hand, AMY-B, XYL-B, AMY-M, GOX and LAC reduced the DT, where the best results were for assays 3 (12 min) and 7 (12.8 min), compared to control (16.2 min). At the central point, it was obtained the worst results (DT of 18 min), which is an excessive development time. GOX and LAC did not show the same behavior of increase the development time than when used individually, suggesting that at the presence of amylolytic and xylan-degrading enzymes their action was suppressed.

These results are similar to those found by Selinheimo et al. (2006) who studied the combined effects of a partially purified fungal laccase (from white-rot fungus *T. hirsuta*) and a *Bacillus* xylanase (Danisco, Denmark). The authors observed a strengthening effect on the rheology of wheat flour dough at low xylanase dosages, when LAC appeared to be predominant, but at high XYL concentrations, the hardening effect of laccase on dough decreased. Their hypothesis is that the strength of interpenetrating polymer networks decreased when the AX fraction was totally cleaved by the xylanases; which under these conditions, the laccase was not able to create an AX network. Flander et al. (2008) suggested that this softening phenomenon is due to radical catalyzed breakdown of the cross-linked arabinoxylan network. Thus, as the most LAC activity is mainly due to the cross-linking of the esterified ferulic acid on the arabinoxylans; with the increasing on AX hydrolysis by XYL, consequently, a proportional LAC activity is decreased.

To flour B, with exception of XYL-F, all studied enzymes affected significantly ($p \leq 0.05$) the development time. XYL-B, AMY-M and AMY-B decreased the DT, mainly due to breakdown of starch and arabinoxylans chains, reducing the rigidity of the resultant dough and facilitating the conditioning of the gluten network. The oxidants and protein cross-linking enzymes (LAC, GOX and TG) increased the DT, by the strengthening effect of the dough, which makes difficult the correct formation of the gluten network.

However, AMY-F and LIP presented same behavior observed for the flour A, surprisingly increasing the DT, whereas the usual effect promoted by amylases and lipases, is the reduction of this parameter. AMY-F is responsible by the hydrolysis of the starch, reducing the suspension viscosity, while LIP is responsible by the lipid hydrolysis releasing of fatty acids (mainly mono and diglycerides) that have good emulsifier properties. Thus, by the activity of these enzymes less mechanical work is required to achieve the optimal development of the

dough. In individually concentration tests (Bueno et al., submitted), AMY-F presented a decrease on DT tending proportionally to the increase of its concentration, while LIP promoted the best reduction on DT at the same concentration of the present work (150 U.kg^{-1}). Thus, as this unusual behavior was observed in the two tested flours, more studies would be necessary to understand how and what enzymes, in fact, interfere with the performance of AMY-F and LIP in a complex enzymatic system.

3.1.4. Stability time

Excluding AMY-F and TG, all enzymes presented significant effects ($p \leq 0.05$) on stability time for flour A. XYL-F, GOX and LIP improved the stability time as can be seen on Table 1 in assays 4 (29.4 min) and 9 (30.1 min) that show the best results compared to control (24.8 min). However, LAC, XYL-B, AMY-M and AMY-B decreased the ST, in the same way that they reduced the development time, which demonstrates a flour weakening effect. Typically, commercial use of these enzymes in combination is for adjustment of FN, shelf life extension and dough strengthening. However, it was observed in the present work, that, together, they present the opposite effect, which may explain the needed of higher concentration of each of them in commercial preparations, aiming to ensure that the enzyme excess will overcome the undesired effects.

For flour B, only XYL-F did not have significant effect ($p \geq 0.05$) for stability time. XYL-B, TG, GOX, AMY-M and XYL-F decreased the ST, which was undesirable because the stability time of control (11.9 min) was already low, as can be seen on assays 3 (8.3 min) and 9 (7.9 min) of Table 1, corresponding to the worst results. LAC, AMY-F and LIP improved the stability time of flour, and they were present on assays 1 (15.9 min), 2 (15.2 min) and 11 (16.9 min).

It is interesting to observe that in a complex enzymatic systems, with many enzymes, even oxidant and cross-linking enzyme as GOX, LAC and TG, did not have the same improvement effects than when they were used individually, and their behavior was completely different to each type of flour sample. Therefore, without considering this combined behavior, it may lead to the use of excessive concentrations of each of them in order to overcome the hindered effects.

3.1.5 W value and P/L ratio

LAC, XYL-B, AMY-B, XYL-F and TG affected significantly ($p \leq 0.05$) the W (10^{-4} J) value of flour A, promoting its reduction, while AMY-M and GOX increased it. LAC and TG reduced the W value, probably by an excessive protein cross-linking effect (Gerrard et al. 1998; Labat et al. 2001; Selinheimo et al. 2006), providing an excessively strong dough with low malleability. As previously discussed, an excessive degradation promoted by xylanases and amylases, can weak the flour, affecting its resistance and reflecting in the value of W (10^{-4} J). The best result for W (10^{-4} J) was in assay 4 ($251 \cdot 10^{-4}$ J), where AMY-M and GOX were present, without the presence of any of the enzymes that decreased the W value. The worst results were at the central point, assays 13 to 15 ($125 \cdot 10^{-4}$ J), far from the control ($238 \cdot 10^{-4}$ J). For the P/L ratio, only AMY-M and TG did not have significant effects ($p \geq 0.05$). AMY-F and the xylanases decreased it, while LAC, GOX, LIP and AMY-B enhanced of the P/L ratio, which is undesirable. Oxidative enzymes usually improve the ratio P/L by strengthening effect, while hydrolytic enzymes usually softs the dough.

The W (10^{-4} J) value of flour B was significantly and beneficially affected ($p \leq 0.05$) by GOX and LAC, and negatively by AMY-F, AMY-B and XYL-B, once oxidative enzymes promote protein cross-linking and strengthening of the dough, and hydrolytic enzymes led to a weakening of flour. As flour B is a limiting weak flour, the effects of these enzymes were more pronounced than in the flour A, who is a stronger flour. Similarly, only GOX and LAC improved ($p \leq 0.05$) the P/L ratio, while hydrolytic enzymes and LIP reduced it. TG, XYL-F and AMY-M did not have significant effect ($p \leq 0.05$) on P/L ratio.

As there were many parameters to be evaluated and many enzymes that affect them in different ways, to select the enzymes for the next experiments, it was selected the enzymes that presented more beneficial effects in the rheology parameters. Thus, for each tested flour, some selected enzymes were studied in a full factorial design, varying their concentrations, while some others had their concentrations fixed in the new experiments. Those enzymes that presented mainly negative effects in the rheology of wheat flour dough, according to the P-B design were eliminated from the mixture. Thus, for flour A, it was selected AMY-B, AMY-M, XYL-B, GOX and LIP. For flour B, it was selected AMY-B, GOX, LAC, and LIP.

3.2 Optimization by full factorial 2^3 design

3.2.1 Flour A

Although more efficient than the others amylases, individually AMY-B needed a high concentration to adjust of the FN. Therefore, its concentration was fixed at $166 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$, and

AMY-M was included in the experimental design, where its concentration varied from 100 to 166 U.kg⁻¹. XYL-B improved the WA, DT and the P/L ratio, and its concentration varied from 100 to 200 U.kg⁻¹. GOX improved the DT, ST and W, but increased undesirably the P/L ratio, evidencing an excessive dosage. Thus, for optimization, its concentration varied from 50 to 150 U.kg⁻¹. LIP was maintained, and its concentration was fixed at 150 U.kg⁻¹ in the experimental design, because it improved the results in the most of evaluated parameters. The results for the full factorial design for flour A is presented in Table 2.

Table 2: 2³ Full factorial design for flour A and rheological effects.

Assay*	AMY-M (U.kg ⁻¹)	XYL-B (U.kg ⁻¹)	GOX (U.kg ⁻¹)	FN	WA	DT	ST	W	P/L
Standard range**	-	-	-	250 - 320	> 56	4 – 10	> 15	200 - 300	> 0.88
Control	-	-	-	420	57.1	12.1	22.8	221	1.31
1	100	100	50	341	56.9	17.0	26.4	184	1.40
2	166	100	50	272	56.0	15.1	24.2	206	1.35
3	100	200	50	333	57.3	14.1	20.4	181	1.14
4	166	200	50	286	57.7	14.0	20.1	186	1.0
5	100	100	150	280	56.6	13.5	31.2	204	1.60
6	166	100	150	291	56.6	15.1	29.3	174	2.04
7	100	200	150	357	56.8	12.1	17.6	192	1.78
8	166	200	150	287	56.0	14.1	24.3	183	1.67
9	133	150	100	289	57.5	11.6	16.0	191	1.56
10	133	150	100	306	56.1	14.4	27.5	160	1.77
11	133	150	100	296	55.6	17.3	25.1	197	1.39

* All assays contained LIP (150 U.kg⁻¹) and AMY-B (166 U.kg⁻¹), previously fixed.

** (Cauvain et al. 2006; Pizzinatto et al. 2004).

As expected, only AMY-M significantly affected ($p \leq 0.05$) the FN. When AMY-M was at minimum concentration, it was not possible to adjust the FN at the ideal range (250 - 310 s). However, from the mean concentration the values were around 289 - 306 seconds. Therefore, the mean concentration, 133 U.kg⁻¹ for AMY-M, was chosen and combined with 166 U.kg⁻¹ for AMY-B, previously fixed, they promoted the FN adjust.

For water absorption, all experiments presented results from 55.6% to 57.7%, which is a good range to baking flour. None of the enzymes significantly affected ($p \geq 0.05$) the farinographic values, being similar to the control. The results were also out of range for W and

P/L ratio. The proportional increase in P/L ratio by raising the concentration of GOX demonstrates an excessive dough strengthening, because it did not increase the value of W, as could be seen on assays 2 and 5 of the Table 2. The softening effects of the hydrolytic enzymes (AMY-M and XYL-B) did not overcome the excessive oxidizing effect on dough.

As could be seen in Figures 1a and 1c, AMY-M and XYL-B did not affect significantly the W value and did not improve it, regardless of increasing in their concentrations, or concentration of GOX. However, as can be observed in Figures 1b and 1d, the P/L ratio enhanced with the increase in the concentration of GOX, showing a dough strengthening effect.

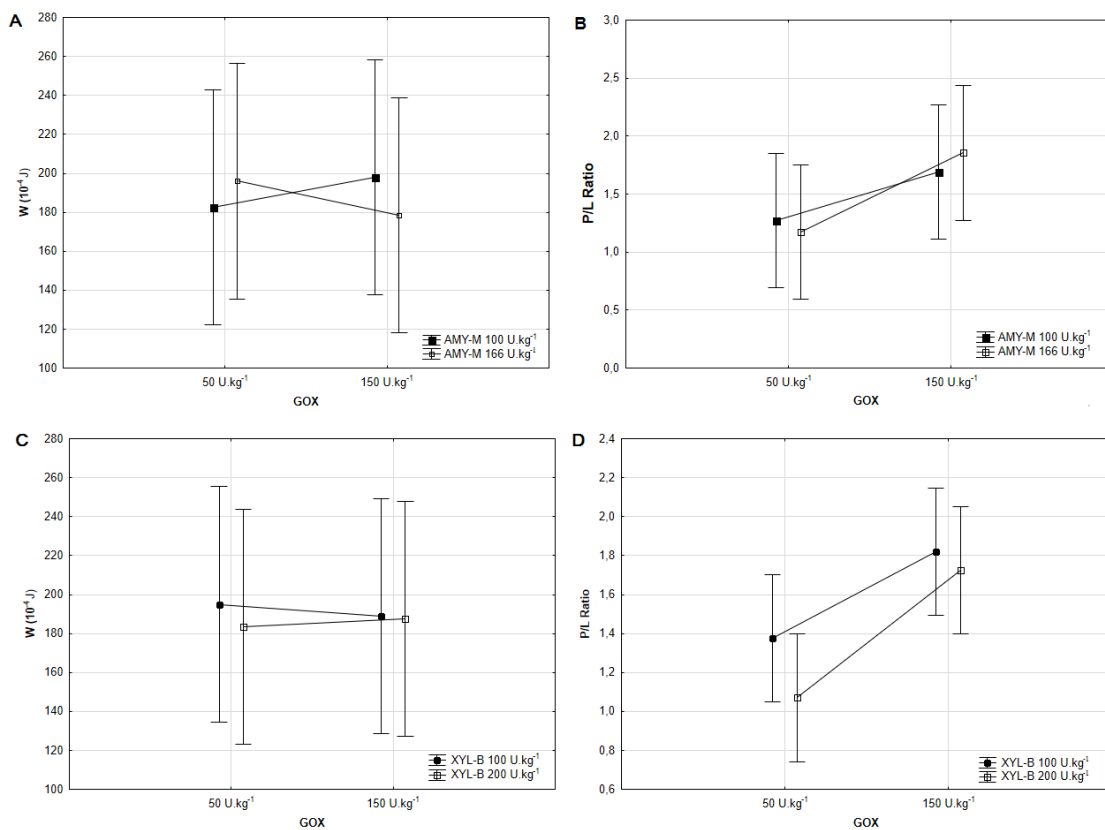


Figure 1: Effects of GOX and AMY-M on (a) W value and (b) P/L ratio and GOX and XYL-B on (c) W value and (d) P/L ratio for flour A.

This effect was more pronounced in the interaction between XYL-B/GOX than the interaction between AMY-M/GOX. The measure of W (10⁻⁴ J) indicates the dough deformation capacity, and P/L ratio, the balance between elasticity and extensibility; thus, low W values combined with high values of P/L ratio demonstrate that this flour will result in excessively strong dough, with stronger than malleable characteristic. This will reflect in compact breads with low volume, because the gases produced during the fermentation step, will not be able to overcome the resistance offered by the dough, preventing its expansion.

Moreover, at low xylanase concentrations, the effect of oxidative enzymes is predominant. Using high xylanase concentrations, an elevated depolymerization of the AX backbone occurred, and GOX could not promote dough strengthening by the AX cross-linking, being the hydrolytic effect of XYL more pronounced (Primo-Martín et al. 2005).

The P/L ratio ideal to baking flour should be around 1, and the values were still too much higher. As can be seen on Figure 1, the reduction of GOX and increase of XYL-B concentrations are important to set this parameter in the optimal range. Thus, the concentrations of GOX and XYL-B were studied in 6 additional experiments, where the AMY-M concentration was fixed in 133 U.kg⁻¹ (Table 3).

Table 3: Effects of XYL-B and GOX concentration to flour A.

Assay*	XYL-B	GOX	FN	WA	DT	ST	W	P/L
Standard range**	-	-	250 - 320	> 56	4 – 10	> 15	200 - 300	> 0.88
Control	-	-	420	57.1	12.1	22.8	221	1.31
1	150	25	300	56.2	15.1	22.4	181	1.36
2	200	25	276	56.1	14.6	21.0	181	1.25
3	150	16	265	55.6	12.1	20.8	194	1.06
4	200	16	296	55.9	14.5	21.0	144	1.81
5	200	0	275	55.7	14.9	20.4	138	2.24
6	150	8	303	55.7	13.1	21.2	239	1.17

* All assays contained LIP (150 U.kg⁻¹), AMY-B (166 U.kg⁻¹) and AMY-M (133 U.kg⁻¹).

** (Cauvain et al. 2006; Pizzinatto et al. 2004).

Initially the GOX concentration was reduced to 25 U.kg⁻¹ and tested with two concentrations of XYL-B (150 and 200 U.kg⁻¹). However, the W was not improved and the P/L ratio remained at high values, indicating that there is still a high strength of the dough caused by excess of GOX dosage. Therefore, the concentration of GOX was reduced to 16 U.kg⁻¹ and tested with the same XYL-B concentrations.

Using 16 U.kg⁻¹ of GOX, at 150 U.kg⁻¹ of XYL-B, the DT and P/L ratio were desirably reduced and W was improved. Increasing the concentration of XYL-B to 200 U.kg⁻¹, the results were out of the standard range for DT, W and P/L ratio. Thus, two additional experiments were carried out: one, eliminating GOX of the mixture and keeping the concentration of XYL-B at 200 U.kg⁻¹, and another by reducing the concentration of both enzymes. When GOX was eliminated, it was observed the worst result for W and P/L ratio, confirming its importance in

the enzyme mixture. So, as the GOX absence or concentrations higher than 16 U.kg⁻¹, combined with 200 U.kg⁻¹ of XYL-B, did not correct the dough rheology to standard ranges, their concentrations were reduced to 8 and 150 U.kg⁻¹, respectively. As can be seen on assay 6 (Table 3), with these concentrations it was possible improve the W value and reduce the P/L ratio, without affect the others parameters. These results demonstrated the importance of GOX on strengthening of the dough, and mainly, how the excess could be prejudicial to alveographic characteristics of flour.

Therefore, after the FN adjust by AMY-B (166 U.kg⁻¹) and AMY-M (133 U.kg⁻¹), it was possible to obtain good dough rheological characteristics for the flour A, by the combined addition of LIP (150 U.kg⁻¹), XYL-B (150 U.kg⁻¹) and GOX (8 U.kg⁻¹). Converting to ppm, this concentrations corresponding to AMY-B (92 ppm), AMY-M (64 ppm), LIP (26 ppm), XYL-B (72 ppm) and GOX (3.5 ppm).

3.2.2 Flour B

In the factorial design of the flour B, AMY-B was maintained because it was more efficient than AMY-F and AMY-M in the FN adjustment. Therefore, in the optimization, its concentration varied from 100 to 200 U.kg⁻¹. Flour B was weak flour with a very low P/L ratio, which means an excessive extensible characteristic, thus, xylanases were excluded. GOX and LAC presented important improvements on W value and P/L ratio when used together, but their effects on others parameters, could indicate excessive dosages. Therefore, they were kept in the factorial design and their concentrations varied from 100 to 200 U.kg⁻¹. LIP was maintained because it had an important effect to improve the W value and its concentration was fixed at 150 U.kg⁻¹.

As could be seen on Table 4, AMY-B significantly affected ($p \leq 0.05$) the FN value, where even the lowest concentration was enough to reach to the desired values. For water absorption, all experiments presented results from 57.5% to 58.7%, which is a good range to baking flour. As could be seen on Figure 2a, at the lowest concentration of oxidant enzymes (LAC 100 U.kg⁻¹ and GOX 100 U.kg⁻¹), the WA was high, regardless of the AMY-B concentration. However, increasing the concentration of one of them, WA was reduced. According to Han et al. (2008), when the strengthening of the gluten networking reaches a certain point, the WA capacity becomes inversely correlated with the enzyme concentration, because it occurs an excessive formation of disulphide bonds in the gluten network, resulting in a hydrophobic character of the protein network and reducing its interaction with water. Thus,

in an enzyme system that has the presence of both oxidizing enzyme (LAC and GOX), they cannot be used both at high concentrations, in order to prevent negative effects on WA.

Table 4: 2³ Full factorial design for Flour B and rheological effects.

Assay*	AMY-B (U.Kg ⁻¹)	GOX (U.Kg ⁻¹)	LAC (U.Kg ⁻¹)	FN	WA	DT	ST	W	P/L
Standard range**	-	-	-	250 - 320	> 56	4 – 10	> 15	200 - 300	> 0.88
Control	-	-	-	343	59.7	7.2	11.9	182	0.77
1	100	100	100	311	58.6	7.4	12.3	202	0.68
2	200	100	100	286	58.2	8.2	15.9	190	0.58
3	100	200	100	276	58.0	7.5	12.8	256	0.78
4	200	200	100	257	57.7	7.8	12.7	202	0.58
5	100	100	200	290	58.6	7.8	17.6	210	0.90
6	200	100	200	287	57.5	7.5	13.5	177	0.79
7	100	200	200	274	58.1	7.6	17.0	187	0.86
8	200	200	200	271	58.1	7.9	15.7	212	0.62
9	150	150	150	264	58.3	7.1	18.2	189	0.75
10	150	150	150	217	58.4	7.8	19.2	204	0.64
11	150	150	150	240	58.3	6.2	16.6	240	0.68

* All assays contained LIP (150 U.kg⁻¹), fixed previously.

** (Cauvain et al. 2006; Pizzinatto et al. 2004).

Thus, the results lead us to believe that, the higher starch hydrolysis rate caused by high concentration of AMY-B (200 U.kg⁻¹) may have promoted a weakening of the flour, although not significantly affected the FN. Additionally, even in the presence of two oxidative enzymes, their strengthening effect on flour was not enough to improve the other rheological parameters. Moreover, it can be concluded that both oxidoreductases (GOX and LAC), cannot be used together at high concentrations, since the rheological parameters were improved when their concentrations were inversely proportional.

None of the enzymes significantly affected ($p \leq 0.05$) the development time that varied from 6.2 to 8.2 minutes, which also is a good range to baking flour. As can be seen on the Figure 2, the best results for all parameters were obtained with AMY-B at 100 U.kg⁻¹. In this condition, it was observed that GOX at 100 U.kg⁻¹ and LAC at 200 U.kg⁻¹, improved WA (Figure 2a), ST (Figure 2b) and P/L ratio (Figure 2d). On the other hand, the best condition to W value (Figure 2c) was observed for GOX at 200 U.kg⁻¹ and LAC at 100 U.kg⁻¹. The results for each

parameter did not present the same behavior when these conditions were at the maximum concentration of AMY-B (200 U.kg^{-1}).

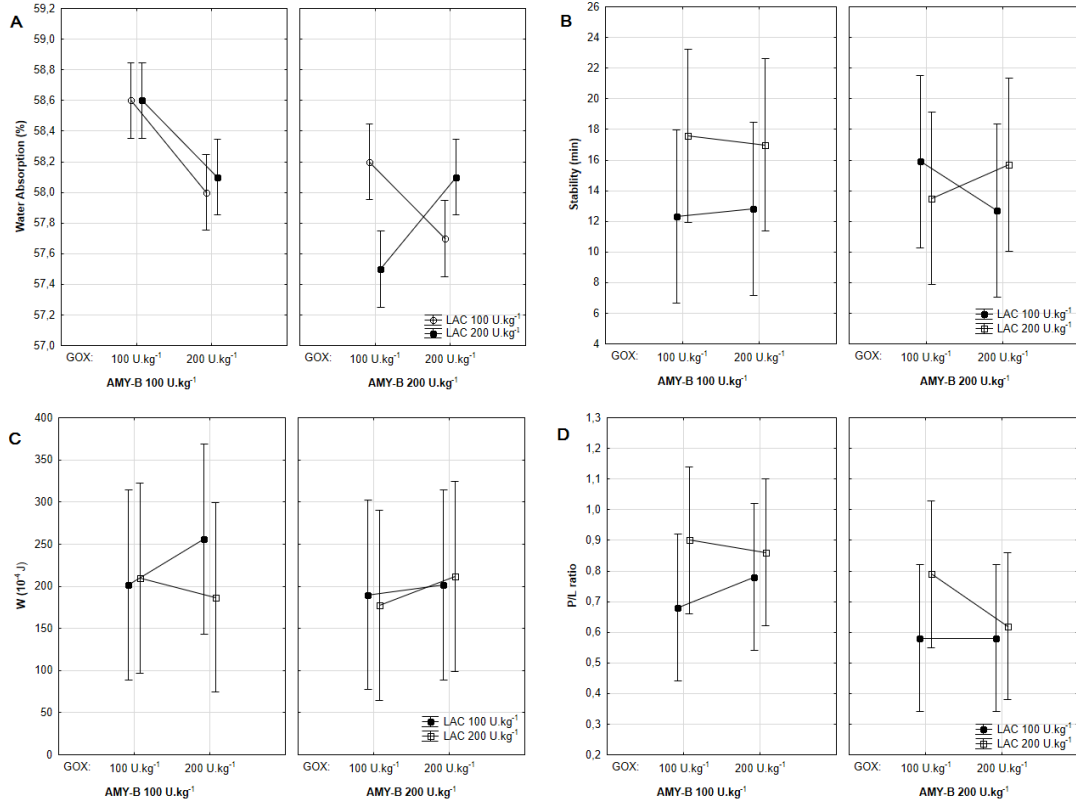


Figure 2: Effects of AMY-B and LAC on (a) water absorption, (b) stability time, (c) W value and (d) P/L ratio for flour B.

The possible explanation is the excessive formation of inter and intramolecular disulphide bonds in the gluten network, which could make the dough excessively strength and difficult its deformation capacity (W , 10^{-4} J). In this way, there would be an increase in the P/L ratio, showing an excess of the tenacity; however, it was not happened, excluding this hypothesis. Therefore, it needs further studies to understand the effects of GOX and LAC concentrations, when they were used together.

Thus, flour B can be improved by the addition of AMY-B (100 U.kg^{-1}), LIP (150 U.kg^{-1}), GOX (100 U.kg^{-1}) and LAC (200 U.kg^{-1}), obtaining all rheological parameters in the optimal range for baking flour. These concentrations correspond to AMY-B (55.5 ppm), LIP (26 ppm), GOX (42 ppm) and LAC (386 ppm). Comparing with flour A (AMY-B 166 U.kg^{-1} and AMY-M 133 U.kg^{-1}), a very lower concentration of amylase was necessary for FN correction. However, as flour B is a weak flour, it was necessary a high

concentration of two oxidative enzymes to improve other rheological parameters, while for the flour A, just a low concentration of GOX (8 U.kg⁻¹) was enough to improve them.

3.3 Comparison of enzymatic and chemical treatments on dough rheological parameters

Besides its good original rheological properties, flour A presented low α -amylase activity, needing correction by exogenous α -amylase addition. Nevertheless, this correction affected the other rheological parameters, by the flour weakening caused by the starch hydrolysis. The most common procedure used by milling industries to readjustment these parameters, is the addition of chemical oxidants, as for example the azodicarbonamide (ADA). ADA is the most widely used oxidant. Thus, ADA was tested as chemical improver for the dough rheology of flours A and B, after the FN correction. The results are presented on Table 5.

Table 5: Comparison of chemical and enzymatic treatment for flours A and B.

	Assay	AMY-B (U.kg ⁻¹)	AMY-M (U.kg ⁻¹)	ADA (ppm)	FN	WA	DT	ST	W	P/L
	Ideal ranges	-	-	-	250 - 320	> 56	4 – 10	> 15	200 - 300	> 0.88
Flour A	Control	-	-	-	420	57.1	12.1	22.8	221	1.31
	Optimal condition*	-	-	-	303	55.7	13.1	21.2	239	1.17
	1	166	133	0	289	55.7	17.0	22.5	166	2.34
	2	166	133	5	289	54.9	14.8	23.5	200	1.81
	3	166	133	10	287	55.1	14.4	21	183	2.63
Flour B	Control	-	-	-	343	59.7	7.2	11.9	182	0.77
	Optimal condition**	-	-	-	290	58.6	7.8	17.6	210	0.90
	1	100	-	10	297	59.0	6.0	10.8	186	0.71
	2	100	-	20	307	58.7	6.9	12.5	208	0.64
	3	100	-	30	302	59.1	6.5	11.2	216	0.69
	4	100	-	40	300	59.2	4.6	10.2	254	0.72

*AMY-B (166 U.kg⁻¹), AMY-M (133 U.kg⁻¹), LIP (150 U.kg⁻¹), XYL-B (150 U.kg⁻¹) and GOX (8 U.kg⁻¹);

**AMY-B (100 U.kg⁻¹), GOX (100 U.kg⁻¹), LAC (200 U.kg⁻¹) and LIP (150 U.kg⁻¹).

As can be observed in Table 5, for flour A, using 10 ppm of ADA, most of the rheological parameters could be adjusted to the ideal ranges, but W value reduced and P/L ratio increased, showing an excessive strengthening of the dough. The P/L ratio indicates the balance

of elasticity and extensibility characteristics of flour, and values close to 1.0 are ideal for baking flours. High values of P/L ratio represent an excessive elastic and resistant flour, which will result in compact breads with low volume. On the other hand, very low values of P/L ratio indicate an extensible flour and with low resistance, which will result in fragile dough without capacity to retain the gases released during the fermentation, also resulting in unsuitable breads. Thus, after the FN adjust, just ADA addition was not enough to improve the rheological parameters of flour A.

Similarly, only correction by ADA was insufficient to improve the rheological parameters of flour B, even with the maximum concentration allowed by Brazilian Health Surveillance Agency – ANVISA – (40 ppm). As can be seen on Table 5, at 40 ppm, the development and stability time were low, and the P/L ratio was far from the minimum required (0.88).

Thus, for flours intended to baking industry, the addition of chemical oxidant and amylases for falling number adjustment are not enough to flour correction. This would represent an economic loss, because a strong flour, as the sample flour A, would be rejected, and used for another purpose of lower added value. On the other hand, a weak flour, as the sample flour B, which is often destined for other uses just by chemical correction, could also be utilized for baking making the enzyme correction, adding value for this raw material.

3.4 Comparison between ideal enzyme concentrations and suppliers' concentrations

In Table 6, it was presented a comparison between the ideal concentrations found in this work to those indicated by the suppliers and the studied when the enzymes used individually (Bueno et al. Submitted). The concentrations required to FN adjust of the flour A by AMY-F and AMY-M, when used individually, are economically unfeasible because at high concentrations, the costs do not justify their use in industry; only AMY-B was able to correct the FN at a low concentration. On the other hand, the combination of AMY-B and AMY-M showed to be a good option to correction of FN, providing a substantial reduction in the AMY-M concentration.

For xylanases, when used individually (Bueno et al. Submitted), the concentrations required to improvement of the flour A were much lower than the recommended by the manufacturers. However, in combination with others enzymes, only XYL-B was effective to improve the rheological parameters, and at a concentration higher than the recommended by suppliers to overcome the excessive elasticity promoted by oxidative enzymes. The suppliers generally suggests a wide range to ensure the efficiency of the enzymes in different profiling

flours. However, by the results obtained, it is possible to conclude that only following the recommendation, the application of xylanases is inefficient.

Table 6: Comparison between ideal studied concentrations and supplier dosage recommended to each enzyme.

Enzymes	Flour A		Flour B		Suppliers		
	Individual ideal concentration*		Combined ideal concentration		Combined ideal concentration		Recommended dosage
	U.kg ⁻¹	ppm	U.kg ⁻¹	ppm	U.kg ⁻¹	ppm	
AMY-F	583	243	-	-	-	-	10 – 20
AMY-B	150	83	166	92	100	55.5	50 – 150
AMY-M	583	280	133	64	-	-	10 – 100
XYL-F	25	11	-	-	-	-	30 – 50
XYL-B	25	12	150	72	-	-	20 – 50
GOX	25	10	8	3.5	100	42	2 – 50
LAC	25	25	-	-	200	386	Not declared
LIP	150	26	150	26	150	26	5 – 50
TG	25	18	-	-	-	-	10 - 30

* Data presented in Bueno et al. (Submitted).

The dosage recommendation for GOX is also very wide to ensure its functionality in several types of flour. Therefore, for strong flours, such flour A, low concentrations were enough to obtain desirable improvements. Moreover, the flour rheological parameters were sensible to GOX concentration, and excessive dosages could be more prejudicial than beneficial, either individually or in combination. For flour B, which was a weak flour, a concentration much higher than the recommended was necessary to adjustment of the rheological parameters.

LAC it is not a usual enzyme employed to baking flour correction. For strong flours, its addition causes excessive oxidation of the flour, mainly in combination with GOX. However, even at a high concentrations, LAC proved to be a good alternative, as well as GOX, for the chemical oxidants, to the improvement on stability time, W value and P/L ratio of the flour B.

LIP showed interesting effects on flour rheology when used individually (Bueno et al. Submitted) and in combination with others enzymes to both flours. The LIP concentrations employed depend largely of the wheat lipid composition. Thus, the decision about the lipase

concentration should always consider its impact on flour rheology, mainly in DT reduction and improvement of W value, independent of the recommendations of the suppliers.

4. CONCLUSION

In this study, it was shown that most of enzymes did not present the same behavior in dough rheology when they are used in combination than when they are used individually. Moreover, for each type of flour, strong or weak, the enzymes presented different effects. Thus, considering only the individual effects of specific enzymes is an unsuitable way, when they are used, generally, in combination with others.

Bacterial and maltogenic α -amylases were more efficient than fungal α -amylase to correction of the Falling Number for both flours. LIP (150 U.kg⁻¹) improved most of evaluated parameters to both flours, mainly the stability time, and it did not present interaction effect with other enzymes. As well as when used alone, TG did not improve the dough rheology, being less efficient than GOX and LAC on strengthening of the dough, and these two enzymes presented cooperative effects in flour correction, especially when used in opposite concentrations. For both types of flour, the addition of azodicarbonamide as chemical oxidant for dough rheology correction was not effective, even at maximum concentration allowed by Brazilian Health Surveillance Agency (40 ppm).

Therefore, it was confirmed that it is possible to perform the full substitution of chemical additives by enzymes in order to adequate and improve the rheological parameters of wheat flours, even for a weak flour, making it suitable for baking. Additionally, further studies using these enzymes in combination should be performed in order to identify their cooperatives and antagonists' interactions in bread formulations or other baking products for both flour samples, as well as to verify if the observed behavior on present work remains in a food matrix; linking the rheological data obtained and the experimental practice.

Acknowledgements

This work was supported by scholarships (MM Bueno) from CAPES/FAPERGS. The authors wish specially thank to Tondo S.A. (Forqueta, Brazil) for kindly supplying the raw material and its laboratory for rheological analysis, as well as AB Enzymes, Granolab S.A., Novozymes and Vallens Food Ingredients for supplying the enzymes used in this research.

REFERENCES

- AACC (2000) *Approved Methods of Analysis*, vol 1-2. 10 edn. St. Paul, MN, USA.: American Association of Cereal Chemists.
- AACC (2009) *Approved Methods of Analysis*. 11 edn. St. Paul, MN, USA.: American Association of Cereal Chemists.
- Barrera GN, León AE & Ribotta PD (2015) Use of enzymes to minimize the rheological dough problems caused by high levels of damaged starch in starch-gluten systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. In Press, 10.1002/jsfa.7374.
- Berrin JG & Juge N (2008) Factors affecting xylanase functionality in the degradation of arabinoxylans. *Biotechnol Lett*. 30(7), 1139-1150.
- Bonet A, Rosell CM, Caballero PA, Gomez M, Perez-Munuera I & Lluch MA (2006) Glucose oxidase effect on dough rheology and bread quality: A study from macroscopic to molecular level. *Food Chemistry*. 99(2), 408-415.
- Buche F, Davidou S, Pomet M, Potus J, Rouille J, Verte F & Nicolas J (2011) Competition for Oxygen Among Oxidative Systems During Bread Dough Mixing: Consequences of Addition of Glucose Oxidase and Lipoxigenase on Yeasted Dough Rheology. *Cereal Chemistry*. 88(5), 518-524.
- Bueno MM, Thys RCS & Rodrigues RC (Submitted) Microbial enzymes as substitutes of chemical additives in baking wheat flour – Part I: Individual effects of nine enzymes on flour rheology. *Food and Bioprocess Technology*.
- Caballero PA, Gomez M & Rosell CM (2007) Improvement of dough rheology, bread quality and bread shelf-life by enzymes combination. *Journal of Food Engineering*. 81(1), 42-53.
- Cauvain SP & Young LS (2006) *The Chorleywood bread process*. Boca Raton, FL.: Woodhead Publishing.
- Cauvain SP & Young LS (2007) *Technology of Breadmaking*, vol 1. 2 edn. New York, USA: Springer.
- Courtin CM & Delcour JA (2001) Relative activity of endoxylanases towards water-extractable and water-unextractable arabinoxylan. *Journal of Cereal Science*. 33(3), 301-312.
- Damodaran SPKLFOR (2008) *Fennema's food chemistry*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis.
- De Souza CFV, Rodrigues RC, Heck JX & Ayub MAZ (2008) Optimization of transglutaminase extraction produced by *Bacillus circulans* BL32 on solid-state cultivation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 83(9), 1306 - 1313.
- Dunnewind B, Van Vliet T & Orsel R (2002) Effect of oxidative enzymes on bulk rheological properties of wheat flour doughs. *Journal of Cereal Science*. 36(3), 357-366.
- Figueroa-Espinoza MC, Poulsen C, Soe JB, Zargahi MR & Rouau X (2004) Enzymatic solubilization of arabinoxylans from native, extruded, and high-shear-treated rye bran by different endo-xylanases and other hydrolyzing enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(13), 4240-4249.
- Flander L, Rouau X, Morel M-H, Autio K, Seppanen-Laakso T, Kruus K & Buchert J (2008) Effects of laccase and xylanase on the chemical and rheological properties of oat and wheat doughs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(14), 5732-5742.
- Gerits LR, Pareyt B, Decamps K & Delcour JA (2014) Lipases and their functionality in the production of wheat-based food systems. *CRF3 Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 13(5), 978-989.

- Gerrard JA, Fayle SE, Wilson AJ, Newberry MP, Ross M & Kavale S (1998) Dough Properties and Crumb Strength of White Pan Bread as Affected by Microbial Transglutaminase. *Journal of Food Science*. 63(3), 472-475.
- Goesaert H, Gebruers K, Courtin CM, Brijs K & Delcour JA (2007) Enzymes in Breadmaking. In: *Bakery Products: Science and Technology*. pp. 337-364.
- Goesaert H, Slade L, Levine H & Delcour JA (2009) Amylases and bread firming - an integrated view. *Journal of Cereal Science*. 50(3), 345-352.
- Han M, Zhang Y, Fei Y, Xu X & Zhou G (2008) Effect of microbial transglutaminase on NMR relaxometry and microstructure of pork myofibrillar protein gel. *European Food Research and Technology*. 228(4), 665-670.
- Joye IJ, Lagrain B & Delcour JA (2009) Endogenous redox agents and enzymes that affect protein network formation during breadmaking - A review. *Journal of Cereal Science*. 50(1), 1-10.
- Labat E, Morel MH & Rouau X (2001) Effect of laccase and manganese peroxidase on wheat gluten and pentosans during mixing. *Food Hydrocolloids*. 15(1), 47-52.
- Leman P, Goesaert H, Vandeputte GE, Lagrain B & Delcour JA (2005) Maltogenic amylase has a non-typical impact on the molecular and rheological properties of starch. *Carbohydrate Polymers*. 62(3), 205-213.
- Lerner A & Matthias T (2015) Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*. 14(6), 479-489.
- Min B & Green BW (2008) Use of microbial transglutaminase and nonmeat proteins to improve functional properties of low NaCl, phosphate-free patties made from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) belly flap meat. *J Food Sci*. 73(5), E218-226.
- Minussi RC, Pastore GM & Durán N (2002) Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*. 13(6-7), 205-216.
- Moers K, Celus I, Brijs K, Courtin CM & Delcour JA (2005) Endoxylanase substrate selectivity determines degradation of wheat water-extractable and water-unextractable arabinoxylan. *Carbohydrate Research*. 340(7), 1319-1327.
- Muralikrishna G & Nirmala M (2005) Cereal α -amylases—an overview. *Carbohydrate Polymers*. 60(2), 163-173.
- Noonan GO, Begley TH & Diachenko GW (2008) Semicarbazide formation in flour and bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(6), 2064-2067.
- Pizzinatto A, Magno CPRS & Campagnolli DMF (2004) *Avaliação e controle de qualidade da farinha de trigo*. Campinas: ITAL.
- Primo-Martín C & Martínez-Anaya MA (2003) Influence of Pentosanase and Oxidases on Water-extractable Pentosans during a Straight Breadmaking Process. *Journal of Food Science*. 68(1), 31-41.
- Primo-Martin C, Valera R & Martinez-Anaya MA (2003) Effect of pentosanase and oxidases on the characteristics of doughs and the glutenin macropolymer (GMP). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(16), 4673-4679.
- Primo-Martín C, Wang M, Lichtendonk WJ, Plijter JJ & Hamer RJ (2005) An explanation for the combined effect of xylanase–glucose oxidase in dough systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85(7), 1186-1196.
- Renzetti S & Arendt EK (2009) Effect of protease treatment on the baking quality of brown rice bread: From textural and rheological properties to biochemistry and microstructure. *Journal of Cereal Science*. 50(1), 22-28.
- Renzetti S, Courtin CM, Delcour JA & Arendt EK (2010) Oxidative and proteolytic enzyme preparations as promising improvers for oat bread formulations: Rheological, biochemical and microstructural background. *Food Chemistry*. 119(4), 1465-1473.

- Selinheimo E, Kruus K, Buchert J, Hopia A & Autio K (2006) Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science*. 43(2), 152-159.
- Stadler RH, Mottier P, Guy P, Gremaud E, Varga N, Lalljie S, Whitaker R, Kintcher J, Dudler V, Read WA & Castle L (2004) Semicarbazide is a minor thermal decomposition product of azodicarbonamide used in the gaskets of certain food jars. *Analyst*. 129(3), 276-281.
- Steffolani ME, D. P, Pérez GT & León AE (2010) Effect of glucose oxidase, transglutaminase, and pentosanase on wheat proteins: Relationship with dough properties and bread-making quality. *Journal of Cereal Science*. 51(3), 366-373.
- Van der Maarel MJ, Van der Veen B, Uitdehaag JC, Leemhuis H & Dijkhuizen L (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. In: *J Biotechnol*, vol 94. vol 2, pp. 137-155. Netherlands.
- Ye J, Wang XH, Sang YX & Liu Q (2011) Assessment of the determination of azodicarbonamide and its decomposition product semicarbazide: Investigation of variation in flour and flour products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(17), 9313-9318.

CAPÍTULO V

5. DISCUSSÃO GERAL

Farinhas de trigo para uso industrial necessitam de características reológicas de massa específicas, a fim de garantir a qualidade dos produtos finais, principalmente se destinadas à panificação. Valores acima ou abaixo das faixas recomendadas podem resultar em mudanças na funcionalidade e maquinabilidade das massas resultantes, afetando a qualidade dos produtos finais. Assim, neste trabalho foi estudado o efeito de 9 enzimas microbianas nos parâmetros reológicos de massas de dois tipos de farinha de trigo, visando a completa substituição dos oxidantes químicos.

Na primeira etapa do estudo, foram avaliados os efeitos individuais de cada enzima sobre os parâmetros reológicos das massas de uma farinha de trigo forte de panificação (farinha A), em relação ao aumento de suas concentrações, comparando com as dosagens recomendadas por cada fabricante. Com os resultados obtidos, as concentrações de cada enzima que promoveram efeitos benéficos sobre estes parâmetros reológicos, foram utilizadas como base para avaliação dos seus efeitos combinados.

Portanto, na segunda etapa do estudo, foram avaliados os efeitos combinados destas enzimas, sobre as características reológicas das massas da farinha A, a fim de se identificar efeitos de cooperação ou antagônicos entre elas. As mesmas concentrações foram testadas em uma farinha fraca de confeitaria (farinha B), a fim de se verificar também, se o mesmo comportamento de interação, permanece em uma farinha de perfil tecnológico diferente. Com base nos resultados, as enzimas que apresentaram melhoria nas características reológicas das massas de ambas as farinhas, foram otimizadas, e seus efeitos foram comparados aos promovidos pela adição de um agente oxidante químico, azodicarbonamida (ADA).

A partir dos dados obtidos em ambos estudos, foi possível observar que as amilases de diferentes fontes apresentam comportamentos diferentes na redução de FN, sendo que AMY-F, quando testada sozinha e também em combinação, sempre foi menos eficiente que as demais. Quando avaliadas individualmente, as melhores combinações para correção de FN e melhoria dos parâmetros reológicos das massas da farinha A foram para AMY-B 150 U.kg⁻¹ (83 ppm) e AMY-M 583 U.kg⁻¹ (280 ppm). Comparando com as dosagens recomendadas pelos fornecedores das enzimas utilizadas, que eram de 50 - 150 ppm para a AMY-B, e de 10 - 100 ppm para AMY-M, pode-se observar que somente pela adição de AMY-M, não seria possível

o ajuste do FN, porque seria necessária uma dosagem maior do que a sugerida, e economicamente impraticável, não justificando seu uso. No entanto, quando foram combinadas, os melhores resultados foram obtidos nas concentrações de 166 U.kg⁻¹ (92 ppm) e 133 U.kg⁻¹ (92 ppm), para cada enzima, respectivamente. Embora a concentração de AMY-B tenha sido mais elevada do que quando adicionada individualmente, proporcionou uma redução considerável na dosagem requerida para AMY-M, demonstrando possuírem efeitos de cooperação.

Para as xilanases, os dados obtidos no primeiro estudo, demonstraram que foi possível melhorar os parâmetros reológicos das massas da farinha A, principalmente o valor de W e a razão P/L, a uma concentração menor do que 25 U.kg⁻¹ para ambas, XYL-F (11 ppm) e XYL-B (12 ppm), quando usadas individualmente. Comparando com as dosagens recomendadas pelos fabricantes, que eram de 30 - 50 ppm e 20 - 100 ppm, respectivamente para cada uma delas, as concentrações ideais identificadas, foram muito menores do que as recomendadas, comprovando a importância de se conhecer o efeito destas enzimas sobre a farinha, permitindo seu uso de forma otimizada. Quando combinadas com as demais enzimas estudadas, foi observado que XYL-F foi menos eficiente do que XYL-B, cuja concentração ótima identificada foi de 150 U.kg⁻¹ (72 ppm) para ambas as enzimas, muito acima do que a concentração necessária quando estas foram usadas individualmente, e muito acima da faixa recomendada pelo fabricante. Desta forma, é possível afirmar que sua performance é prejudicada pela ação de outras enzimas quando usadas em combinação, necessitando de concentrações mais elevadas para obtenção dos parâmetros reológicos desejados.

A faixa de dosagem (2 – 50 ppm) sugerida pelos fabricantes de GOX é bem ampla para assegurar sua funcionalidade em vários tipos de farinhas. Desta forma, para farinhas fortes, como é o caso da farinha A usada no presente estudo, baixas concentrações são suficientes para a obtenção de melhorias nas suas características reológicas. Quando usada individualmente, foi identificada que sua concentração ideal era de 25 U.kg⁻¹ (10 ppm), muito acima do que a concentração requerida quando usada em combinação (Artigo 2) com as demais enzimas, 8 U.kg⁻¹ (3,5 ppm). Assim, é possível afirmar que existe um efeito de cooperação da GOX, principalmente em combinação com amilases e xilanases, para melhoria dos parâmetros de tenacidade das massas.

Quando avaliada individualmente, LAC promoveu importantes melhorias nos parâmetros de tempo de estabilidade (ST) e razão P/L, a uma concentração de 25 U.kg⁻¹. No entanto, quando testada em combinação com as demais enzimas, LAC piorou a maioria dos

resultados, não demonstrando ser uma boa alternativa para o tratamento de farinhas fortes, como é o caso da farinha A.

Tanto quando testada individualmente, e quando testada em combinação, a uma concentração de 150 U.kg^{-1} (26 ppm), LIP afetou positivamente a maioria dos parâmetros avaliados, especialmente na melhoria de W e na redução do tempo de desenvolvimento (DT), estando de acordo com as recomendações dos fornecedores (5 - 50 ppm). Portanto, nas condições testadas, não foi possível observar efeitos de cooperação ou antagônicos em relação a LIP e as demais enzimas avaliadas.

Quando testada individualmente e em combinação, TG não promoveu importantes melhoras nas propriedades avaliadas, não justificando seu uso na correção de farinha, visto que ainda é uma enzima relativamente cara, mesmo em baixa concentração. Concordando com os resultados obtidos no presente trabalho, os efeitos promovidos por GOX, a tornam uma melhor alternativa do que TG, para o fortalecimento de massas, baseado em seu comportamento sobre a reologia.

Com base nestes resultados, as mesmas combinações enzimáticas foram aplicadas à farinha B, onde, semelhante ao resultado encontrado na farinha A, AMY-B e AMY-M foram mais eficientes do que AMY-F para a correção de FN. Para a farinha A, a combinação de AMY-B (166 U.kg^{-1}) e AMY-M (133 U.kg^{-1}), foi observada como a melhor condição, enquanto que para a farinha B, somente a adição de AMY-B (100 U.kg^{-1}) foi suficiente.

Tanto as amilases quanto as xilanases, influenciaram a redução da capacidade de absorção de água (WA) em ambas farinhas, pela hidrólise das cadeias de amido e das arabinosilanas, e, conseqüentemente, reduzindo o tempo de desenvolvimento e a estabilidade, caracterizando o enfraquecimento da estrutura das farinhas.

Na farinha A, XYL-B (150 U.kg^{-1}) foi mais eficiente do que XYL-F (150 U.kg^{-1}), demonstrando interação com GOX (8 U.kg^{-1}) na melhoria de W e razão P/L. Na farinha B, XYL-F e XYL-B promoveram efeitos negativos sobre a reologia das massas, por causa de seu efeito de abrandamento, que piorou esta farinha já excessivamente extensível.

GOX (100 U.kg^{-1}) e LAC (200 U.kg^{-1}) demonstraram efeito cooperativo no fortalecimento da farinha B, tal como evidenciado pela melhoria na estabilidade, valor W e a razão P/L. No entanto, estes efeitos benéficos só ocorreram quando ambas enzimas estavam em concentrações inversamente proporcionais. De modo que, quando ambas estavam juntas nas concentrações máximas ou mínimas, os resultados não foram satisfatórios. Mas quando uma delas estava na concentração mínima e a outra na concentração máxima, os parâmetros alveográficos (W e razão P/L) das massas foram melhorados.

Da mesma forma que na farinha A, nas condições testadas, não foi possível observar efeitos de cooperação ou antagônicos em relação a LIP com as demais enzimas avaliadas. Na concentração de 150 U.kg^{-1} , LIP promoveu importantes melhoras nos parâmetros reológicos, destacando-se a melhora na estabilidade das massas. TG apresentou o mesmo comportamento observado para a farinha A, cujos efeitos na reologia das massas resultantes, não justificam seu uso na correção de farinhas.

Para todos os planejamentos experimentais executados, quando na condição de ponto central, em que todas as enzimas estão presentes, foram observados os piores resultados reológicos para ambas as farinhas A e B, confirmando que a ideia de que a combinação de múltiplas enzimas em um único sistema, baseado somente em seus efeitos individuais, é inapropriada.

Após a correção do FN com as respectivas amilases em suas concentrações ótimas identificadas para as farinhas A e B, ambas as farinhas foram adicionadas de ADA a fim de se obter a melhoria dos parâmetros reológicos distorcidos com a correção da atividade de α -amilase.

Para a farinha A, foi observado que após a correção do FN, os parâmetros alveográficos (W e P/L) foram prejudicados, e a adição de ADA não foi eficiente para readequá-la nos valores padronizados, ideais para panificação. Frente a isto, certamente a farinha A, embora de qualidade, seria destinada para outros fins, que não a panificação, devido a impossibilidade de ser melhorada somente pela adição de ADA, comprovando que o tratamento enzimático, nas combinações e concentrações ótimas, é uma alternativa melhor aos aditivos químicos.

Para a farinha B, foi observado que, após a correção do FN, os parâmetros alveográficos (W e P/L), que já se encontravam abaixo dos padrões desejados, foram prejudicados. A adição de ADA, mesmo na concentração máxima permitida pela legislação (40 mg/kg de farinha), não foi o suficiente para a correção da farinha, até os valores padronizados para panificação. Enquanto que, através da combinação enzimática, todos os parâmetros reológicos foram melhorados, podendo-se, desta forma, destinar esta farinha, até então considerada de baixa qualidade, para a panificação.

CAPÍTULO VI

6. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, conclui-se que os objetivos propostos foram alcançados plenamente. A partir de uma farinha padrão, foi possível observar os efeitos de 9 enzimas comerciais – sendo 3 amilases, 2 xilanases, 1 glicose oxidase, uma lacase, uma lipase e transglutaminase – sobre as propriedades reológicas da massa, proporcionalmente ao aumento de sua concentração, assim como afirmar que o conhecimento do comportamento de interação entre estas enzimas pode auxiliar na racionalização de seu uso, frente às recomendações de cada fabricante.

Foi possível evidenciar que a maioria das enzimas não apresentam o mesmo comportamento sobre a reologia das massas, quando utilizadas em combinação, comprovando que a utilização de várias enzimas, considerando apenas seus efeitos individuais, é equivocada e ineficiente. Além disso, para cada perfil de farinha, forte ou fraca, as enzimas apresentaram efeitos diferentes. A combinação ótima encontrada para a farinha A foi: AMY-B (166 U.kg⁻¹), AMY-M (133 U.kg⁻¹), LIP (150 U.kg⁻¹), XYL-B (150 U.kg⁻¹) e GOX (8 U.kg⁻¹); enquanto que para a farinha B, a combinação ótima foi: AMY-B (100 U.kg⁻¹), GOX (100 U.kg⁻¹), LAC (200 U.kg⁻¹) e LIP (150 U.kg⁻¹).

Por conseguinte, confirmou-se que é possível efetuar a substituição completa de aditivos químicos por enzimas, na correção de farinhas, a fim de melhorar e adequar convenientemente os parâmetros reológicos de farinhas de trigo.

Mais do que isso, através da combinação enzimática, foi possível melhorar as propriedades reológicas de uma farinha nacional, considerada fraca e geralmente destinada a outros fins, em uma farinha de qualidade, com as características de uma farinha forte, tornando-a adequada para a panificação; representando uma alternativa para minimizar a dependência de matéria-prima importada e o melhor aproveitamento da matéria-prima nacional.

Baseado nos resultados encontrados, abrem-se possibilidades para trabalhos futuros, cujos estudos estão sendo conduzidos para investigar os efeitos combinados das enzimas na formulação de pães, para ambas as amostras de farinha, a fim de identificar se as interações cooperativas e antagonistas, identificadas no presente trabalho, permanecem em uma matriz alimentar; permitindo associar os dados reológicos obtidos e a prática experimental.

Com isso, espera-se determinar a melhor combinação enzimática para obtenção de produtos de panificação semelhantes aos produtos convencionais de referência no mercado, produzidos com aditivação química, propondo a total substituição de aditivos químicos utilizados no setor de panificação, além de se comprovar que através da adequada combinação enzimática, é possível destinar farinhas consideradas tecnologicamente inferiores para a panificação industrial, como já evidenciado nos testes reológicos.

Além disso, estudos mais aprofundados serão necessários a fim de se investigar o comportamento não usual de TG na redução da capacidade de absorção de água da farinha. Também será necessário identificar quais os fatores chaves da combinação LAC/XYL que promovem a supressão do efeito de LAC, prevalecendo o efeito de XYL sobre a reologia quando utilizadas em combinação. Por fim, serão necessários mais estudos para identificação dos fatores de interação entre GOX/LAC que determinam que seu uso em concentrações inversamente proporcionais, potencializa seus efeitos na melhoria dos parâmetros reológicos, enquanto que sua combinação em concentrações iguais, sejam mínimas ou máximas, os pioram.

REFERÊNCIAS

AACC. **Approved methods of the American Association of Cereal Chemists**. 10. St. Paul, MN, USA: American Association of Cereal Chemists, 2000.

_____. **Approved Methods of Analysis**. 11. St. Paul, MN, USA.: American Association of Cereal Chemists, 2009.

AHMAD, Z. et al. Xylanolytic modification in wheat flour and its effect on dough rheological characteristics and bread quality attributes. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 723-729, Dec 2013.

ALMEIDA, E. L.; CHANG, Y. K. Effect of the addition of enzymes on the quality of frozen pre-baked French bread substituted with whole wheat flour. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 64-72, Nov 2012.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257-270, May 1992.

BANKAR, S. B. et al. Glucose oxidase — An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 489-501, Jul-Aug 2009.

BARRERA, G. N.; LEÓN, A. E.; RIBOTTA, P. D. Use of enzymes to minimize the rheological dough problems caused by high levels of damaged starch in starch-gluten systems. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. In Press, p. 10.1002/jsfa.7374, 2015.

BATAILLON, M. et al. Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus* sp strain SPS-0. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 2-4, p. 187-192, Feb 2000.

BECALSKI, A. et al. Semicarbazide in Canadian bakery products. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, n. 2, p. 107-109, Feb 2006.

BECKER, N. B. et al. Propriedades das enzimas α -amilase e xilanase comerciais e sua influência na reologia da massa e na qualidade do pão de forma. **Evidência**, v. 9, n. 1-2, Jan-Dez 2012.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 4. Berlin: Springer, 2009.

BELTON, P. S.; TAYLOR, J. R. N. **Pseudocereals and less common cereals: grain properties and utilization potential**. Berlin; New York: Springer, 2002.

BERNFELD, P. Amylase, α and β . In: (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v.1, 1955. cap. 17, p.149-158.

BIELY, P. et al. Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, v. 57, n. 1-3, p. 151-166, Sep 1997.

BON, E. P. S. E.; FERRERA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia produção, aplicações e mercado**. 1. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 506.

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia industrial: Fundamentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 254.

BRASIL, B. C. D. Taxas de Câmbio: Cotações e Boletins. 2016. Disponível em: < <http://www4.bcb.gov.br/pec/taxas/port/ptaxnpesq.asp?id=txcotacao> >. Acesso em: 14/02/2016.

BRASIL, M. D. A., PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Regulamento Técnico do Trigo**. Instrução Normativa nº 38, de 30 de novembro de 2010. MAPA. Brasil 2010.

BUCHÉ, F. et al. Competition for Oxygen Among Oxidative Systems During Bread Dough Mixing: Consequences of Addition of Glucose Oxidase and Lipoxygenase on Yeasted Dough Rheology. **Cereal Chemistry**, v. 88, n. 5, p. 518-524, Sep-Oct 2011.

BULÉON, A. et al. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, n. 2, p. 85-112, Aug 1998.

CABALLERO, P. A.; GOMEZ, M.; ROSELL, C. M. Improvement of dough rheology, bread quality and bread shelf-life by enzymes combination. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 42-53, Jul 2007.

CAUVAIN, S. P.; NOVOZYMES. **Breadmaking : improving quality**. 2. Oxford: Woodhead Publishing Limited, 2012. 832.

CAUVAIN, S. P.; YOUNG, L. S. **Technology of Breadmaking**. 2. New York, USA: Springer, 2007. 397.

CAUVAIN, S. P.; YOUNG, L. S. **The ICC Handbook of Cereals, Flour, Dough & Product Testing : Methods and Applications**. Lancaster, USA: DEStech Publications, Inc., 2009. 504.

CIUCU, A.; PATROESCU, C. Fast Spectrometric Method of Determining the Activity of Glucose Oxidase. **Analytical Letters**, v. 17, n. 12, p. 1417-1427, 1984.

COLLAR, C.; BOLLAIN, C. Impact of microbial transglutaminase on the staling behaviour of enzyme-supplemented pan breads. **European Food Research and Technology**, v. 221, n. 3-4, p. 298-304, Aug 2005.

COLLINS, T. et al. Use of glycoside hydrolase family 8 xylanases in baking. **Journal of Cereal Science**, v. 43, n. 1, p. 79-84, Jan 2006.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos | Quarto levantamento - 01/2016**. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, 2016. 154.

COSTA, M. D. G. D. et al. Qualidade tecnológica de grãos e farinhas de trigo nacionais e importados. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 28, p. 220-225, Jan-Mar 2008.

COURTIN, C. M.; DELCOUR, J. A. Relative activity of endoxylanases towards water-extractable and water-unextractable arabinoxylan. **Journal of Cereal Science**, v. 33, n. 3, p. 301-312, Aug 2001.

_____. Arabinoxylans and Endoxylanases in Wheat Flour Bread-making. **Journal of Cereal Science**, v. 35, n. 3, p. 225-243, May 2002.

DE SOUZA, C. F. V. et al. Optimization of transglutaminase extraction produced by *Bacillus circulans* BL32 on solid-state cultivation. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. 9, p. 1306 - 1313, Sep 2008.

DOBRA SZCZYK, B. J.; MORGENSTERN, M. Rheology and the breadmaking process. **Journal of Cereal Science**, v. 38, n. 3, p. 229-245, Nov 2003.

DUNNEWIND, B.; VAN VLIET, T.; ORSEL, R. Effect of oxidative enzymes on bulk rheological properties of wheat flour doughs. **Journal of Cereal Science**, v. 36, n. 3, p. 357-366, Nov 2002.

EDWARDS, W. P. **The science of bakery products**. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2007. 274.

EL-DASH, A. A. **Fundamentos da tecnologia de panificação**. São Paulo: Coodenadoria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1982. 400.

FIGUEROA-ESPINOZA, M. C. et al. Enzymatic solubilization of arabinoxylans from native, extruded, and high-shear-treated rye bran by different endo-xylanases and other hydrolyzing enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 13, p. 4240-4249, Jun 2004.

FIGUEROA-ESPINOZA, M. C.; ROUAU, X. Oxidative cross-linking of pentosans by a fungal laccase and horseradish peroxidase: Mechanism of linkage between feruloylated arabinoxylans. **Cereal Chemistry**, v. 75, n. 2, p. 259-265, Mar-Apr 1998.

FLANDER, L. et al. Effects of laccase and xylanase on the chemical and rheological properties of oat and wheat doughs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 14, p. 5732-5742, Jul 2008.

GARCIA, T. A. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus***. 2006. 110 Doutorado em Biologia Molecular. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília - DF.

GERITS, L. R. et al. Lipases and their functionality in the production of wheat-based food systems. **CRF3 Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 5, p. 978-989, 2014.

GERRARD, J. A. et al. Dough Properties and Crumb Strength of White Pan Bread as Affected by Microbial Transglutaminase. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 3, p. 472-475, 1998.

GOESAERT, H. et al. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 1-3, p. 12-30, Jan-Mar 2005.

GOESAERT, H. et al. Enzymes in Breadmaking. In: (Ed.). **Bakery Products: Science and Technology**, 2007. p.337-364.

GOESAERT, H. et al. Amylases and bread firming - an integrated view. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 3, p. 345-352, 2009.

GROSSOWICZ, N. et al. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 187, n. 1, p. 111-25, Nov 1950.

GUPTA, R. et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, Jun 2003.

HUI, Y. H.; ZHOU, W. **Bakery Products Science and Technology**. 2. Wiley-Blackwell, 2014. 736.

INDRANI, D. et al. Scanning Electron Microscopy, Rheological Characteristics, and Bread-Baking Performance of Wheat-Flour Dough as Affected by Enzymes. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 9, p. 2804-2809, Nov 2003.

JOYE, I. J.; LAGRAN, B.; DELCOUR, J. A. Use of chemical redox agents and exogenous enzymes to modify the protein network during breadmaking – A review. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 1, p. 11-21, 7// 2009.

KURAIISHI, C.; YAMAZAKI, K.; SUSU, Y. TRANSGLUTAMINASE: ITS UTILIZATION IN THE FOOD INDUSTRY. **Food Reviews International**, v. 17, n. 2, p. 221-246, 2001/02/04 2001.

LABAT, E.; MOREL, M. H.; ROUAU, X. Effect of laccase and manganese peroxidase on wheat gluten and pentosans during mixing. **Food Hydrocolloids**, v. 15, n. 1, p. 47-52, Jan 2001.

LEMAN, P. et al. Maltogenic amylase has a non-typical impact on the molecular and rheological properties of starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, n. 3, p. 205-213, Dec 2005.

LEONOWICZ, A.; GRZYWNOWICZ, K. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, n. 1, p. 55-58, Jan 1981.

LERNER, A.; MATTHIAS, T. Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 14, n. 6, p. 479-489, Jun 2015.

LINKO, Y.-Y.; JAVANAINEN, P.; LINKO, S. Biotechnology of bread baking. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 10, p. 339-344, Oct 1997.

MATTINEN, M. L. et al. Effect of protein structure on laccase-catalyzed protein oligomerization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 23, p. 8883-8890, 2006.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MINUSSI, R. C.; PASTORE, G. M.; DURÁN, N. Potential applications of laccase in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 6–7, p. 205-216, Jun 2002.

MOERS, K. et al. Endoxylanase substrate selectivity determines degradation of wheat water-extractable and water-unextractable arabinoxylan. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 7, p. 1319-1327, May 2005.

MONDAL, A.; DATTA, A. K. Bread baking – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 86, n. 4, p. 465-474, Jun 2008.

MONTENEGRO, F. M. **Avaliação do desempenho tecnológico de misturas de farinhas de triticale e trigo em produtos de panificação**. 2011. 94 Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal α -amylases—an overview. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 2, p. 163-173, May 2005.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger principios de bioquímica**. Barcelona: Eds. Omega, 2006.

NOONAN, G. O.; BEGLEY, T. H.; DIACHENKO, G. W. Semicarbazide formation in flour and bread. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 2064-2067, Mar 2008.

ORNELLAS, L. H. **Técnica dietética seleção e preparo de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2001.

PALMA, M. B.; FURIGO JUNIOR, A. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. 2003. 169 Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

PIZZINATTO, A.; MAGNO, C. P. R. S.; CAMPAGNOLLI, D. M. F. **Avaliação e controle de qualidade da farinha de trigo**. Campinas: ITAL, 2004. 67.

POUTANEN, K. Enzymes: An important tool in the improvement of the quality of cereal foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 9, p. 300-306, Sep 1997.

PRIMO-MARTÍN, C.; MARTÍNEZ-ANAYA, M. A. Influence of Pentosanase and Oxidases on Water-extractable Pentosans during a Straight Breadmaking Process. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 1, p. 31-41, Jan 2003.

PRIMO-MARTÍN, C. et al. An explanation for the combined effect of xylanase–glucose oxidase in dough systems. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 7, p. 1186-1196, 2005.

PY-DANIEL, K. R. **Atividades amilolíticas identificadas em bibliotecas metagenômicas da microbiota do solo do Cerrado**. 2010. 101 Mestrado em Biologia Molecular. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília.

QUAGLIA, G. **Ciencia y tecnología de la panificación**. Zaragoza: Acribia, 1991.

QUEJI, M. F. D.; SCHEMIN, M. H. C.; TRINDADE, J. L. F. Propriedades reológicas da massa de farinha de trigo adicionada de alfa-amilase. **Publicatio UEPG-Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias**, v. 12, n. 02, 2009.

RENZETTI, S.; ARENDT, E. K. Effect of protease treatment on the baking quality of brown rice bread: From textural and rheological properties to biochemistry and microstructure. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 1, p. 22-28, Jul 2009.

SAMPAIO, M. C. R. R. **Influência das condições de processamento na estrutura e comportamento mecânico de espumas estruturais injetadas com agentes expansores químicos**. 2004. 75 Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em em Ciência e Engenharia de Polímeros). Departamento de Engenharia de Polímeros, Universidade do Minho, Guimarães, Portugal.

SANTOS, I. J. D. et al. Expressão da alfa e beta amilase durante a germinação de cevada. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, p. 67 - 73, 2010.

SELINHEIMO, E. et al. Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. **Journal of Cereal Science**, v. 43, n. 2, p. 152-159, Mar 2006.

SOARES, C. et al. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 79, n. 1-3, p. 1-3, Mar 1999.

STADLER, R. H. et al. Semicarbazide is a minor thermal decomposition product of azodicarbonamide used in the gaskets of certain food jars. **Analyst**, v. 129, n. 3, p. 276-281, Mar 2004.

STAMPFLI, L.; NERSTEN, B.; MOLTEBERG, E. L. Effects of emulsifiers on farinograph and extensograph measurements. **Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 523-530, Dec 1996.

STAUFFER, C. E. **Functional additives for bakery foods**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1990.

STEAR, C. A. **Handbook of breadmaking technology**. London; New York: Elsevier Applied Science, 1990.

STEFFOLANI, M. E. et al. Effect of glucose oxidase, transglutaminase, and pentosanase on wheat proteins: Relationship with dough properties and bread-making quality. **Journal of Cereal Science**, v. 51, n. 3, p. 366-373, May 2010.

VAN DER MAAREL, M. J. et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 137-155, Mar 2002.

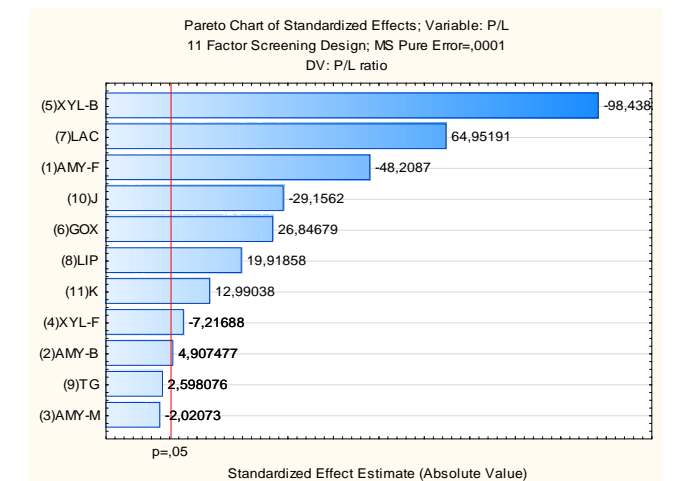
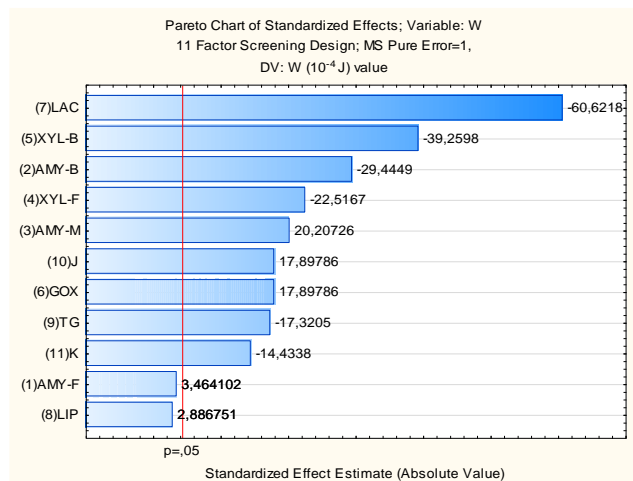
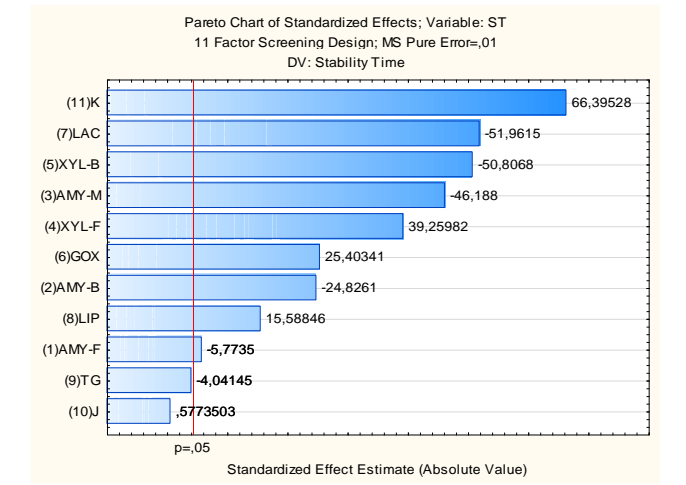
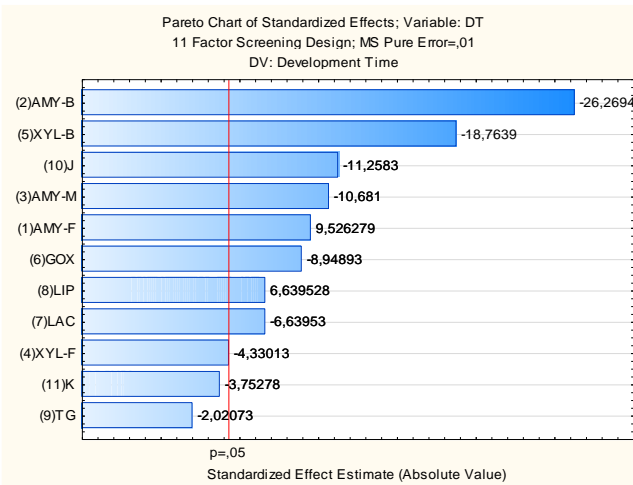
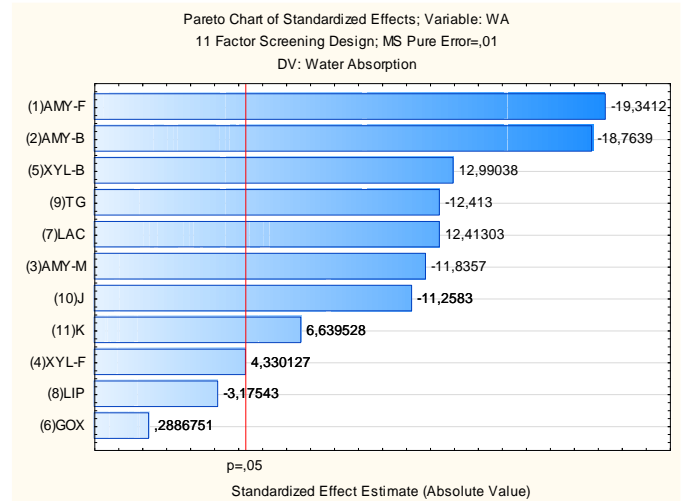
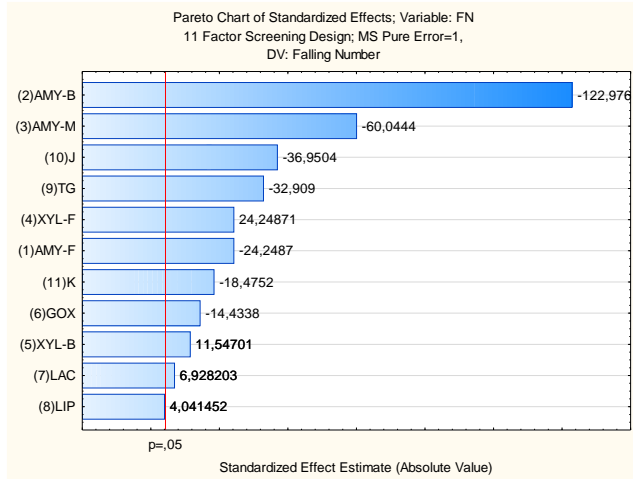
WONG, D. W. S. **Food enzymes: Structure and Mechanism**. 1. New York: Chapman & Hall, 1995. 390.

YE, J. et al. Assessment of the determination of azodicarbonamide and its decomposition product semicarbazide: Investigation of variation in flour and flour products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 17, p. 9313-9318, 2011.

YÚFERA, E. P. **Química de los alimentos**. Madrid: Síntesis, 1998.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Gráficos de Pareto: Planejamento experimental Plackett-Burman farinha A



APÊNDICE B – Gráficos de Pareto: Planejamento experimental Plackett-Burman farinha B

