

UTILIZAÇÃO DE PROTEASES DE ORIGEM BACTERIANA E
FÚNGICA NA PRODUÇÃO DE BISCOITOS SEMIDOCES DUROS

21/89

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

UTILIZAÇÃO DE PROTEASES DE ORIGEM BACTERIANA E FUNGICA
NA PRODUÇÃO DE BISCOITOS SEMIDOCES DUROS

Parcer

*Este exemplar corresponde
a redação final da tese
defendida por Maria*

Emília Cesar Bruno e

MARIA EMILIA CESAR BRUNO

aprovada pela Comissão

Engenheira Química

Julgadora em 21-07-89.

Campinas, 21 de julho/89

PROFa. DRa. CELINA R. O. CAMARGO

Orientadora

Dr. Celina Camargo
Presidente da Banca

TESE APRESENTADA A FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, PARA A OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

CAMPINAS

1989.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

- REVISÃO DE LÍNGUA PORTUGUESA -

Prof. Ademir Araújo Filho

À Profa. Norma Mancilla Diaz (*in memoriam*),

com muitas saudades e diante do mais
profundo reconhecimento de sua importân-
cia na minha formação acadêmica e humana.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Celina Raquel de Oliveira Camargo, pela orientação, apoio e dedicação no desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Norma Mancilla Diaz, *in memoriam*, pela orientação e apoio na fase inicial dessa tese.

Ao Prof. Dr. César Francisco Ciacco, pelo apoio e colaboração técnica.

À Profa. Dra. Maria Amélia Chaib Moraes, pela orientação e auxílio na interpretação dos resultados da análise sensorial.

À Miles do Brasil Ltda., pelo fornecimento de enzimas e informações técnicas.

À Companhia Campineira de Alimentos, pela oportunidade de realizar os testes em escala industrial.

À Elizabeth Borges Gonçalves, pela colaboração na análise estatística.

Ao Eduardo Miranda, pelo auxílio na análise estatística, tradução dos artigos em alemão e datilografia da tese.

Ao Prof. Ademir Araújo Filho, pela revisão de língua portuguesa dessa tese.

À CAPES e UNICAMP, pelo suporte financeiro da pesquisa.

Ao Dudu, pelo amor, carinho e infinita compreensão.

Aos meus pais, por terem me dado condições afetivas e materiais de chegar até aqui e por nunca me terem faltado.

À Wilma, Ademir, Viça, Maninho, Jó, pela amizade e bom humor.

Ao pessoal do Laboratório de Cereais, pelo apoio e amizade durante o trabalho.

Aos colegas, professores e funcionários do DTA, pela
convivência agradável.

À ABIA, pelas cópias da tese.

Aos amigos, mineiros e paulistas, pelo carinho e apoio.

ÍNDICE GERAL

	PÁGINA
ÍNDICE DAS TABELAS.....	vii
ÍNDICE DOS GRÁFICOS.....	ix
ÍNDICE DAS FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xiii
I - INTRODUÇÃO.....	1
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1 - Características do Trigo e da Farinha de Trigo para Biscoitos e "Crackers".....	4
2 - Processamento Industrial de Biscoitos Semidoces Duros.....	6
3 - Enzimas Proteolíticas em Panificação.....	8
3.1 - Histórico.....	8
3.2 - Conceituação.....	9
3.3 - Mecanismo de Ação.....	10
3.4 - Fontes Convencionais.....	12
3.5 - Determinação da Atividade Proteolítica de Preparados Enzimáticos.....	14
3.5.1 - Método da Hemoglobina.....	15
3.5.2 - Método da Viscosidade da Gelatina.....	16
3.5.3 - Método do Farinógrafo.....	16
4 - Determinação da Proteólise na Massa através de Métodos Reológicos.....	17
4.1 - Farinógrafo Brabender.....	18
4.2 - Alveógrafo Chopin.....	20
4.3 - Extensógrafo Brabender.....	22

5 - Efeito das Proteases no Processamento de Pães e Biscoitos.....	23
5.1 - Proteases no Processamento de Pães.....	24
5.2 - Proteases no Processamento de Biscoitos.....	26
III - MATERIAL E MÉTODOS.....	30
A - MATERIAL.....	30
1 - Matéria-Prima.....	30
2 - Reagentes e Ingredientes.....	30
2.1 - Reagentes.....	30
2.2 - Ingredientes.....	31
3 - Aparelhos e Equipamentos.....	31
3.1 - Testes Laboratoriais.....	31
3.2 - Testes Industriais.....	32
B - MÉTODOS.....	34
1 - Caracterização das Farinhas de Trigo.....	34
1.1 - Testes Químicos.....	34
1.2 - Testes Físico-Químicos.....	34
1.3 - Testes Reológicos.....	34
2 - Processamento dos Biscoitos Semidoces Duros em Laboratório.....	35
2.1 - Formulação Padrão.....	35
2.2 - Mistura.....	36
2.3 - Descanso.....	37
2.4 - Laminação.....	37
2.5 - Corte.....	37

2.6 - Cozimento.....	38
2.7 - Resfriamento.....	38
3 - Caracterização das Massas de Biscoito Semidoce Duro.....	38
3.1 - Determinação das Características Reológicas.....	38
3.1.1 - Utilização do Farinógrafo Brabender.....	39
3.1.2 - Utilização do Extensógrafo Brabender.....	39
3.2 - Determinação do pH.....	40
4 - Estudo dos Fatores que Afetam a Proteólise nas Massas de Biscoito Semidoce Duro.....	41
4.1 - Escolha dos Parâmetros Reológicos para a Determinação da Proteólise nas Massas.....	41
4.2 - Efeito da Adição de Proteases de Origem Fúngica e Bacteriana nas Massas.....	42
4.3 - Efeito do Tempo de Descanso das Massas na Proteólise.....	42
4.4 - Efeito do pH das Massas na Proteólise.....	42
4.5 - Efeito da Temperatura das Massas na Proteólise.....	43
5 - Caracterização dos Biscoitos Produzidos em Laboratório....	43
5.1 - Determinação do pH.....	43
5.2 - Determinação da Umidade.....	44
5.3 - Medidas Físicas.....	44
5.4 - Avaliação da Qualidade.....	45
6 - Processamento dos Biscoitos Semidoces Duros na Indústria.....	46
6.1 - Formulação.....	46
6.2 - Mistura.....	46
6.3 - Descanso.....	47
6.4 - Laminação.....	47
6.5 - Estampa e Corte.....	48
6.6 - Cozimento.....	49

6.7 - Resfriamento.....	50
6.8 - Embalagem.....	50
7 - Caracterização dos Biscoitos Produzidos na Indústria.....	50
7.1 - Determinação do pH.....	50
7.2 - Determinação da Umidade.....	51
7.3 - Medidas Físicas.....	51
7.4 - Análise Sensorial.....	51
8 - Análise Estatística.....	54
8.1 - Estimativa dos Desvios-Padrão dos Métodos de Determinação da Consistência Final, Resistência à Extensão, Resistência Máxima e Extensibilidade....	54
8.2 - Verificação da Possibilidade de Associação entre os Parâmetros Reológicos e a Concentração de Protease.....	55
8.3 - Estimativa do Desvio-Padrão do Método de Determinação do Volume dos Biscoitos.....	55
8.4 - Avaliação Estatística das Medidas Físicas e da Análise Sensorial dos Biscoitos Industriais.....	55
IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
1 - Caracterização das Farinhas de Trigo.....	57
1.1 - Composição Centesimal.....	57
1.2 - Testes Físico-Químicos.....	57
1.3 - Testes Reológicos.....	59
2 - Escolha dos Parâmetros Reológicos para a Determinação da Proteólise nas Massas de Biscoito Semidoce Duro.....	63
2.1 - Uso do Parâmetro Farinográfico: Consistência Final.....	63

2.2 - Uso dos Parâmetros Extensográficos:	
Extensibilidade, Resistência à Extensão e	
Resistência Máxima.....	65
2.2.1 - Medidas da Extensibilidade das Massas.....	65
2.2.2 - Medidas da Resistência à Extensão e	
Resistência Máxima das Massas.....	67
3 - Efeito da Adição de Proteases de Origem Fúngica e	
Bacteriana nas Massas.....	70
4 - Efeito do Tempo de Descanso das Massas na Proteólise.....	73
5 - Efeito do pH das Massas na Proteólise.....	78
6 - Efeito da Temperatura das Massas na Proteólise.....	80
7 - Processamento dos Biscoitos Semidoces Duros	
em Laboratório.....	84
8 - Caracterização dos Biscoitos Produzidos em Laboratório....	86
8.1 - Umidade e pH.....	86
8.2 - Medidas Físicas.....	88
8.3 - Avaliação da Qualidade.....	92
9 - Processamento dos Biscoitos Semidoces Duros	
na Indústria.....	96
9.1 - Preparo da Massa-Padrão.....	96
9.2 - Preparo da Massa com Protease Bacteriana	
sem Descanso.....	97
9.3 - Preparo da Massa com Protease Bacteriana	
com Descanso.....	100
10 - Caracterização dos Biscoitos Produzidos na Indústria.....	102
10.1 - Umidade e pH.....	102
10.2 - Medidas Físicas.....	104
10.3 - Análise Sensorial.....	109
V - CONCLUSÕES.....	113

VI - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	116
--------------------------------------	-----

ÍNDICE DAS TABELAS

	PÁGINA
Tabela I: Composição Química das Farinhas de Trigo.....	58
Tabela II: Características Farinográficas das Farinhas de Trigo.....	60
Tabela III: Características Extensográficas das Farinhas de Trigo.....	62
Tabela IV: Extensibilidade das Massas com Protease Bacteriana.....	66
Tabela V: Características das Massas para a Produção dos Biscoitos em Laboratório.....	85
Tabela VI: Umidade e pH dos Biscoitos Produzidos em Laboratório.....	87
Tabela VIIa: Medidas Físicas dos Biscoitos Produzidos em Laboratório.....	89
Tabela VIIb: Medidas Físicas dos Biscoitos Produzidos em Laboratório.....	90
Tabela VIII: Avaliação da Qualidade dos Biscoitos Produzidos em Laboratório.....	93

Tabela IX:	Umidade e pH dos Biscoitos	
	Produzidos na Indústria.....	103
Tabela Xa:	Medidas Físicas dos Biscoitos	
	Produzidos na Indústria.....	105
Tabela Xb:	Medidas Físicas dos Biscoitos	
	Produzidos na Indústria.....	106
Tabela XI:	Análise Sensorial dos Biscoitos	
	Produzidos na Indústria.....	110

ÍNDICE DOS GRÁFICOS

PÁGINA

Gráfico 1: Efeito da adição de protease bacteriana na consistência final das massas.....	64
Gráfico 2: Efeito da adição de protease bacteriana na resistência à extensão (RE) e resistência máxima (RM) das massas.....	69
Gráfico 3: Efeito da adição de protease fúngica na resistência à extensão (RE) e resistência máxima (RM) das massas.....	71
Gráfico 4: Efeito do tempo de descanso na resistência à extensão (RE) das massas.....	74
Gráfico 5: Efeito do tempo de descanso na resistência máxima (RM) das massas.....	75
Gráfico 6: Efeito do pH na resistência à extensão (RE) e resistência máxima (RM) das massas.....	79
Gráfico 7: Efeito da temperatura na resistência à extensão (RE) das massas.....	81
Gráfico 8: Efeito da temperatura na resistência máxima (RM) das massas.....	82

ÍNDICE DAS FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1: Efeito da redução (I), da oxidação (II) e da proteólise (III) no desenvolvimento da rede do glúten na massa (Fonte: PYLER, 1973).....	11
Figura 2: Esquema do sistema de laminação industrial.....	48
Figura 3: Modelo da ficha utilizada na análise sensorial dos biscoitos.....	53
Figura 4: Extensogramas de massas de biscoito com e sem descanso para as concentrações de 400 e 1000 ppm de protease bacteriana.....	77
Figura 5: Biscoitos produzidos em laboratório.....	95
Figura 6: Biscoitos produzidos na indústria.....	112

RESUMO

A necessidade de utilização de condicionadores de massa na produção industrial de biscoitos semidoces duros advém do uso de farinhas de trigo com características tecnológicas inadequadas ao processamento. Esses aditivos são normalmente usados para enfraquecer o glúten, tornando a massa adequada às etapas de laminação, formação e cozimento.

No Brasil, esses problemas vêm sendo solucionados através da adição de agentes redutores como os sulfitos e derivados, especialmente o bissulfito de sódio. Entretanto, o uso desses aditivos em produtos de panificação não é permitido pela legislação brasileira de alimentos.

O objetivo deste trabalho foi estudar a possibilidade de se utilizarem proteases comerciais de origem fúngica ou bacteriana como aditivos naturais em substituição ao bissulfito de sódio.

Foram selecionados os parâmetros reológicos resistência à extensão e resistência máxima, determinados no extensógrafo Brabender, como indicadores da proteólise na massa.

A protease bacteriana estudada apresentou uma ação mais eficaz do que a fúngica na hidrólise do glúten nas condições analisadas.

A influência da concentração da enzima, tempo de ação, pH e temperatura na atividade da protease bacteriana nas massas de biscoito foi avaliada através de testes extensográficos. Nesse estudo, foram estabelecidas as condições de processamento de biscoitos em laboratório, que foram posteriormente adaptadas às condições industriais para a produção de biscoitos tipo "Maizena".

Os resultados dos testes de laboratório e

industriais mostraram ser tecnologicamente viável a produção de biscoitos com protease bacteriana com características físicas e sensoriais similares àquelas tradicionalmente obtidas com bissulfito de sódio.

SUMMARY

The necessity of the use of dough conditioners in the industrial production of hard semi sweet cookies is a consequence of the utilization of wheat flours with technological characteristics inadequate to the processing. These additives are normally used to weaken the gluten, rendering the dough adequate to the laminating, forming and baking stages.

In Brazil, these problems have been solved through the addition of reducing agents such as sulfites and derivates, especially sodium bisulfite. However, the use of these additives in baking products is not permitted by Brazilian food legislation.

The aim of this work was to study the possibility of using commercial proteases from fungal or bacterial sources as natural additives in substitution for sodium bisulfite.

The rheological parameters resistance to extension and maximum resistance, measured with the aid of the Brabender extensigraph, were selected as indicators of dough proteolysis.

The bacterial protease studied showed a more effective action than the fungal one in the hydrolysis of the gluten under the analyzed conditions.

The influence of enzyme concentration, duration of action, pH and temperature on the activity of the bacterial protease in cookie doughs was determined by means of extensigraphic tests. In this study, laboratory processing conditions were established, which were afterwards adapted to the industrial conditions of production of "Maizena"-type cookies.

The results of the laboratory and industrial tests have shown it to be technologically feasible to produce cookies with the use of bacterial proteases presenting physical and

sensory characteristics similar to those traditionally obtained with the sodium bisulfite.

I - INTRODUÇÃO

Os biscoitos e "crackers" são produzidos em grande quantidade e variedade. Esses produtos diferem entre si pelas proporções dos ingredientes principais: farinha, água, açúcar, gordura, além de outros usados em menores quantidades (TANILLI, 1976).

A farinha de trigo constitui o principal ingrediente das formulações de biscoitos e "crackers", pois fornece a matriz em torno da qual os outros ingredientes (endurecedores e/ou amaciadores) são misturados para formar a massa (EL DASH *et alii*, 1982). As farinhas para biscoitos devem ser produzidas a partir de trigos moles, entretanto, algumas vezes podem ser usadas, em misturas, quantidades limitadas de trigos duros de baixo teor de proteína (PRATT, 1978).

No Brasil, o controle de qualidade das farinhas produzidas pelos moinhos é muito deficiente com relação às suas características tecnológicas. A comercialização é realizada sem as especificações do tipo de farinha e também sem a sua indicação para uma determinada finalidade, ao contrário do que é feito em outros países. Isso leva à necessidade de adequação das farinhas disponíveis através da otimização dos processos de produção e/ou da utilização de aditivos nas formulações dos produtos desejados.

Um dos principais problemas das indústrias no processamento de biscoitos se refere à aglomeração das proteínas formadoras de glúten, o que provoca a retração da massa após a laminação - decorrente da elasticidade dessas proteínas - e o endurecimento excessivo do produto final (MONNIER & GODON, 1975).

Esses problemas relativos à qualidade da farinha de trigo para a produção industrial de biscoitos podem ser

solucionados através da adição de agentes redutores como os sulfitos e derivados. Atualmente, no Brasil, o bissulfito de sódio vem sendo amplamente empregado com a função de enfraquecer o glúten e condicionar a massa para o processamento, embora a sua adição em produtos de panificação não seja autorizada pela legislação em vigor (ABIA, 1988). Além disso, a liberação de grupos tióis pela ação desses aditivos na massa pode resultar em mudanças indesejáveis no aroma e no sabor dos biscoitos (CHASEBORG, 1981).

Com a adição de proteases, que reduzem a força elástica do glúten, essas dificuldades de processamento também podem ser evitadas, possibilitando-se a utilização de farinhas fortes originalmente inadequadas à produção de biscoitos. Além disso, essas enzimas podem reduzir o tempo de mistura e de descanso necessários para o desenvolvimento da massa (BARRETT, 1975; GAMS, 1976; GABOR *et alii*, 1982).

As proteases também podem agir sobre as propriedades organolépticas do produto final, através da liberação de aminoácidos que, durante a fermentação e o cozimento, participam de reações que são responsáveis pelo escurecimento desejável dos biscoitos e pela formação de aroma e sabor (LYONS, 1982).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade de se utilizarem proteases comerciais de origem fúngica e bacteriana em substituição ao bissulfito de sódio, na produção de biscoitos semidoces duros com o intuito de se contornarem os problemas de processamento relacionados à qualidade da farinha. Para isso foram estudados, através de testes reológicos, alguns fatores que afetam a proteólise na massa, tais como concentração da enzima, tempo de reação, pH e temperatura.

Nesse estudo, foram estabelecidas as condições de processamento dos biscoitos em laboratório, que foram posteriormente adaptadas às condições industriais para a produção de biscoitos tipo "Maizena".

II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 - Características do Trigo e da Farinha de Trigo para Biscoitos e "Crackers"

Os trigos pertencentes à espécie Triticum vulgare podem ser agrupados em dois tipos principais denominados trigos duros e moles. A farinha obtida a partir de variedades de trigo duro é usada principalmente na produção de pães. Os trigos moles, por sua vez, produzem farinhas particularmente adequadas à fabricação de produtos quimicamente aerados, tais como bolos, biscoitos e massas em geral (PYLER, 1973).

Na maioria dos países produtores de trigo, os biscoitos e "crackers" são produzidos principalmente a partir de trigos moles de inverno, de variedades branca e vermelha. No Brasil, são cultivadas basicamente variedades de trigos moles comercializadas sem qualquer tipo de classificação.

O trigo mole apresenta propriedades únicas adequadas à produção de biscoitos e "crackers", tais como conteúdo de proteína relativamente baixo e propriedades de glúten mais suaves. A seleção de trigos moles de boa qualidade é extremamente importante, uma vez que as características desejadas na farinha e no produto final devem estar presentes no trigo (TANILLI, 1976).

As farinhas para biscoitos e "crackers" devem ser produzidas a partir de trigos moles, entretanto, algumas vezes podem ser usadas, em misturas, quantidades limitadas de trigos duros de baixo teor de proteína (PRATT, 1978). O conteúdo de proteínas dos trigos moles é relativamente baixo (8,0 - 11,0%), quando comparado ao dos trigos duros (11,0 - 14,0%) (ZELENY, 1978).

As farinhas destinadas à produção de biscoitos e "crackers" geralmente não recebem tratamento especial ou aditivos, isto é, elas não são branqueadas ou quimicamente amadurecidas e não contêm agentes químicos de crescimento. A adição de malte e de ingredientes de enriquecimento é opcional (TANILLI, 1976).

As farinhas de trigo mole podem ser diferenciadas das farinhas de trigo duro pelo conteúdo protéico mais baixo, menor capacidade de retenção de água, menores quantidades de amido danificado, menor tolerância à mistura, granulometria mais fina e estrutura de glúten menos elástica e mais extensível (EL DASH et alii, 1982).

As farinhas de trigo para a produção de biscoitos podem ser classificadas, de acordo com a sua força, em farinhas fracas, médias ou fortes, o que está diretamente relacionado ao teor e à qualidade das proteínas. A seleção do tipo adequado de farinha dependerá do seu uso final. Os "crackers" devem ser produzidos a partir de farinhas fortes, devido ao estágio-esponja do processo de fabricação caracterizado por uma fermentação prolongada. Entretanto, os biscoitos semidoces duros devem ser produzidos com farinhas fracas e médias, para minimizar o problema da retração das massas nas operações subsequentes à mistura (TANILLI, 1976).

Para garantir a uniformidade na qualidade do produto final, a farinha deve ser submetida a testes químicos, físico-químicos e reológicos. O conteúdo de proteínas, tanto do trigo quanto da farinha, é considerado um dos melhores índices individuais do comportamento da farinha em panificação (PYLER, 1973).

Os testes reológicos podem ser feitos usando-se o farinógrafo e o extensógrafo Brabender ou o alveógrafo Chopin para

determinar a força da farinha e avaliar o desempenho da mesma em panificação. Estes testes possibilitam conhecer a absorção de água da farinha, as propriedades de mistura e as características de elasticidade e extensibilidade da massa. As farinhas usadas na produção de biscoitos devem apresentar baixa absorção de água (48 a 52%), baixa estabilidade à mistura (1 a 2 minutos) e valores médios e baixos para os parâmetros extensibilidade e resistência à extensão, respectivamente (PRATT, 1978).

O teste do fator de expansão ("spread factor"), que relaciona o comprimento e a espessura dos biscoitos, simulando as condições reais de processamento em laboratório, é também um bom indicador do comportamento de farinhas para biscoitos e "crackers". As farinhas classificadas como fracas, médias e fortes apresentam fator de expansão nas faixas de 8,5 - 10, 7,5 - 9 e 6,5 - 8, respectivamente (TANILLI, 1976).

A escolha adequada de farinhas para biscoitos e "crackers" deve ser feita considerando-se os resultados dos testes químicos, físico-químicos e reológicos e dos testes que simulam a produção de biscoitos em escala laboratorial ("baking tests"). Estes últimos testes são decisivos na avaliação da adequabilidade de uma farinha para um determinado fim (MANSOUR, 1982).

2 - Processamento Industrial de Biscoitos Semidoces Duros

Os biscoitos semidoces duros são comumente consumidos no Brasil, Canadá, Inglaterra e em outros países da Europa. No Brasil, esse tipo de biscoito é conhecido comercialmente com os nomes de "Maria", "Maizena", "Manteiga", "Leite" etc., dependendo do tipo de essência e/ou de ingredientes utilizados (VITTI *et alii*, 1988).

A farinha de trigo recomendada para a produção desses biscoitos é do tipo médio ou fraco. No Brasil, costuma-se empregar amido de milho para diluir a farinha e reduzir a força elástica do glúten. A porcentagem de adição está na faixa de 10-15% em relação à farinha. Os demais ingredientes usados nesse tipo de biscoito são: açúcar, açúcar invertido, gordura, sal, agentes de crescimento, água, ácido láctico etc.

Os misturadores empregados no processamento são do tipo vertical, com duas ou três pás e com velocidades que podem variar entre 20 e 40 rpm. O tempo de mistura está na faixa de trinta a cinquenta minutos, dependendo das condições do processamento. O ponto final da massa pode ser controlado pela temperatura, que não deve ultrapassar 38°C. De acordo com o método direto de mistura usado para esses biscoitos, todos os ingredientes são adicionados antes de se ligar o misturador.

Normalmente, é introduzido um período de 30 a 60 minutos de descanso da massa, entre o final da mistura e o início da laminação. Quando agentes redutores como sulfitos e derivados são incorporados à formulação, não há necessidade do referido descanso (WADE, 1970).

Após a mistura ou descanso, a massa é conduzida a uma moega alimentadora para ser submetida ao processo de laminação. Nessa etapa, a massa passa através de pares de rolos laminadores, onde sofre redução da espessura de forma gradual e uniforme. A massa laminada é, então, cortada através de prensa estampadora ou rolos rotativos. O retalho de massa formado após o corte é reincorporado à linha de produção no início da laminação.

O cozimento dos biscoitos é feito em fornos contínuos divididos em zonas de aquecimento com controle independente de temperatura, o que permite ajustes de acordo com

cada produto (AICHELE, 1981). A temperatura e o tempo de cozimento dependem das condições de processamento de cada planta. Em geral, o tempo de cozimento varia entre 3 e 5 minutos, e as temperaturas se encontram na faixa de 170 a 270 °C, de modo a se obterem biscoitos com umidade final entre 3 e 4%. Após o cozimento, os biscoitos são resfriados em esteiras de lona antes de serem embalados. No resfriamento, os biscoitos semidoces duros perdem cerca de 16% da umidade restante após o cozimento (EL DASH, *et alii*, 1982).

3 - Enzimas Proteolíticas em Panificação

3.1 - Histórico

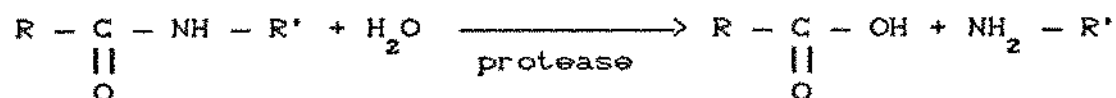
A utilização de proteases em panificação data de 1920, ganhando maior importância por volta de 1950, quando se iniciou a substituição das amilases do malte pelas amilases fúngicas. Embora os preparados de amilases fúngicas tenham sido originalmente usados em panificação para aumentar a atividade amilolítica, as enzimas proteolíticas contaminantes provocavam modificações significativas na massa. Quando se usavam farinhas médias e fracas ou quando os horários de produção permitiam a mistura das massas por períodos de tempo adequados, o efeito amaciante das proteases era desnecessário ou até mesmo indesejável. Por outro lado, quando o uso de farinhas fortes e os tempos curtos de mistura combinados causavam dificuldades no escoamento regular da produção, o efeito das proteases mostrou-se de grande valia. Os preparados de enzimas passaram, então, a ser padronizados com relação às atividades proteolítica e amilolítica (SHELLENBERGER, 1971; PYLER, 1973).

Atualmente, através da grande experiência na produção industrial de enzimas microbianas, é possível produzirem-se preparados de amilases praticamente livres de proteases e preparados de proteases com baixa atividade amilolítica. Dessa forma, as enzimas podem ser melhor caracterizadas, o que permite um maior controle da suplementação enzimática em panificação (MONNIER & GODON, 1975; BARRETT, 1975). De acordo com SPRÖBLER (1981), a pesquisa do efeito das proteases na massa continua difícil e amplamente empírica. Entretanto, com o conhecimento das características da farinha e do produto que se deseja obter, é possível estabelecer um tratamento específico.

3.2 - Conceituação

As enzimas que atuam sobre as proteínas, transformando-as em compostos mais simples, tais como peptídeos e aminoácidos, são chamadas de enzimas proteolíticas, proteases ou proteinases. As proteases pertencem à classe das hidrolases, enzimas que quebram moléculas pela introdução de água (BOBBIO, 1984).

As proteases hidrolisam as ligações peptídicas das proteínas, levando à formação de grupos amina (NH_2) e carboxila (COOH) e originando polipeptídeos de menor peso molecular e, em última instância, aminoácidos simples.



As proteases são específicas, ou seja, elas não hidrolisam moléculas de proteína em qualquer ligação peptídica,

mas apenas em ligações entre certos aminoácidos específicos. Se tais ligações existirem abundantemente na proteína, pode-se esperar uma considerável degradação protéica. Por outro lado, existem proteases que não são tão específicas quanto à composição aminoacídica e podem, portanto, hidrolisar a proteína em vários fragmentos menores (SPRÖBLER, 1981).

3.3 - Mecanismo de Ação

Existem vários critérios de classificação das proteases baseados no mecanismo de ação das mesmas. Um deles divide as proteases em proteases-serina, proteases-SH, metaloproteases e proteases ácidas (HARTLEY, 1960; LÖFFLER, 1986). Do ponto de vista tecnológico, é considerada mais satisfatória a classificação das proteases em endopeptidases e exopeptidases (SPRÖBLER, 1981).

As exopeptidases atuam nos extremos da cadeia protéica liberando aminoácidos como produtos finais. Sua eficácia na transformação das características reológicas das proteínas é limitada devido à mudança relativamente pequena no comprimento da cadeia. Dessa forma, essas enzimas não apresentam importância tecnológica, quando se trata da modificação das propriedades do glúten da farinha de trigo no processamento de pães e biscoitos. Por outro lado, as características do glúten na massa são claramente modificadas pela ação das endopeptidases. Essas enzimas são capazes de agir em vários sítios ao longo da cadeia protéica, liberando grandes fragmentos moleculares e modificando a viscosidade das massas, mesmo com a quebra de poucas ligações.

Durante muito tempo, as proteases foram consideradas como agentes redutores, devido à analogia dos efeitos

causados por essas duas famílias de substâncias sobre as propriedades físicas do glúten (MONNIER & GODON, 1975).

A ação das enzimas proteolíticas e dos agentes redutores e oxidantes no desenvolvimento da massa está ilustrada na figura 1 (PYLER, 1973).

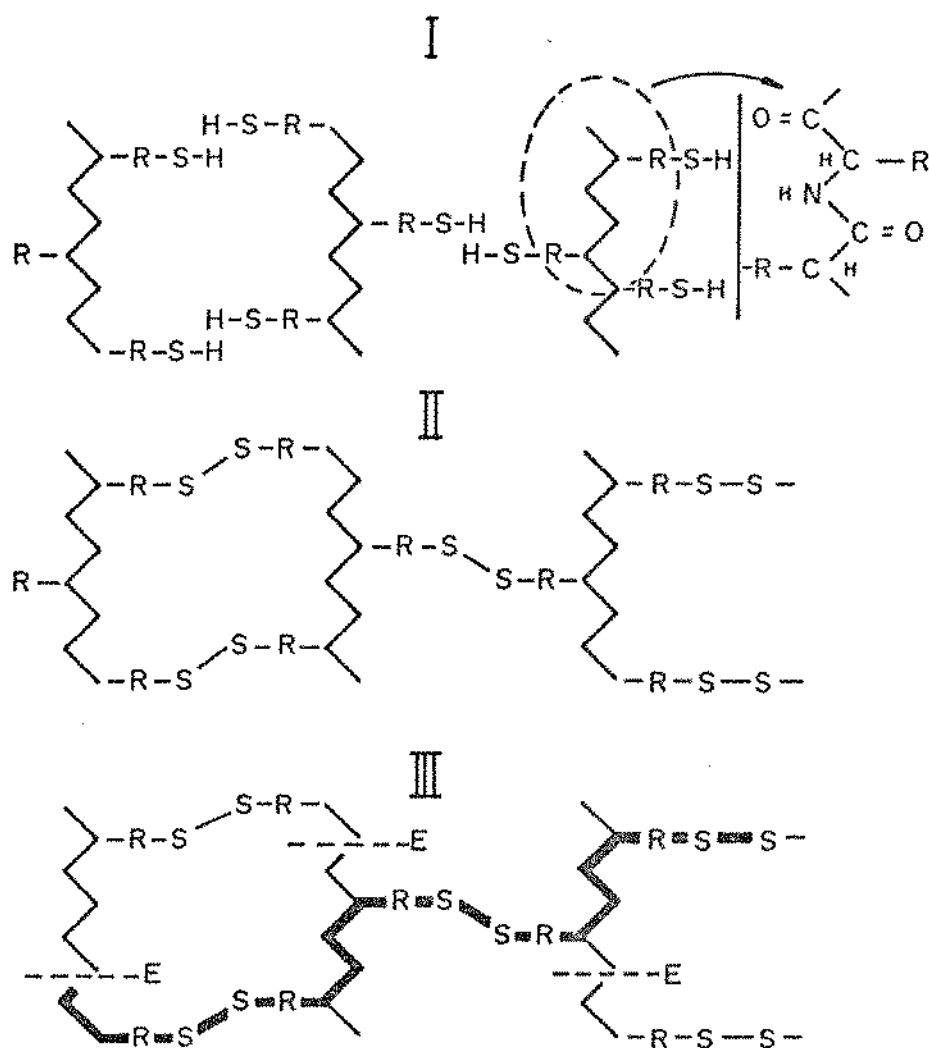


Figura 1 - Efeito da redução (I), da oxidação (II) e da proteólise (III) no desenvolvimento da rede do glúten na massa (Fonte: PYLER, 1973).

As ligações S-S representam uma das principais interações entre as cadeias protéicas adjacentes e dão força à rede do glúten. Os agentes redutores quebram essas ligações

formando grupos S-H que não têm efeito ligante, o que torna a massa macia e extensível. Esse mecanismo está ilustrado na seção I da figura 1. Os agentes oxidantes, por sua vez, promovem a oxidação de grupos S-H para formar as ligações S-S entre as cadeias, tornando a massa rígida e elástica (seção II). Finalmente, as enzimas proteolíticas hidrolisam as cadeias de proteínas nas ligações peptídicas, criando no sistema linhas protéicas transversais e diagonais unidas por pontes S-S (seção III). Dessa forma, ocorre uma nova orientação das cadeias através da formação de ligações frágeis, que podem ser facilmente rompidas.

3.4 - Fontes Convencionais

As proteases podem se originar de diferentes fontes como a farinha de trigo, as leveduras, os cereais maltados, as proteases de origem vegetal (papaína, bromelina e ficina) e os preparados enzimáticos obtidos a partir de culturas bacterianas e fúngicas (PETIT & AUDIDIER, 1967).

Cereais como trigo e cevada contêm níveis muito baixos de proteases mesmo após a germinação, o que aumenta consideravelmente o conteúdo de amilases dos cereais (PYLER, 1973). As enzimas proteolíticas naturais da farinha de trigo apresentam pouca ou nenhuma ação sobre as proteínas do glúten, embora elas apresentem considerável eficácia sobre outras proteínas como hemoglobina, caseína e gelatina (REED, 1967). Além disso, as partes do grão de trigo mais ricas em proteases, o gérmen e principalmente a camada de aleurona, são separadas durante o processo de moagem. Foi observado que quanto menor o teor de cinzas de uma farinha menor será a sua atividade

proteolítica (PETIT & AUDIDIER, 1967; SPRÖBLER, 1981).

Dentre as proteases exógenas à farinha, devem ser consideradas as proteases da levedura. Entretanto, tem sido afirmado que nenhuma ação proteolítica ocorre, exceto quando as células das leveduras são rompidas (MONNIER & GODON, 1975; SPRÖBLER, 1981).

Durante muito tempo, utilizou-se como fonte de proteases exógenas a adição de malte à farinha de trigo. A desvantagem do uso do malte é não permitir que proteases sejam adicionadas sem o aumento simultâneo do conteúdo de amilases. As farinhas de malte diferem amplamente na sua constituição e no potencial enzimático. Além disso, apresentam atividade proteolítica baixa em relação à atividade amilolítica. O grão germinado apresenta atividade proteolítica 10 a 15 vezes superior à do grão são, enquanto a atividade amilolítica é aumentada de 2 a 3 mil vezes com a germinação (AMOS, 1955; GUILBOT, 1972). Deve-se, portanto, trabalhar com uma fonte de proteases tão pura quanto possível. Este é o caso das enzimas proteolíticas industriais obtidas a partir de vegetais, bactérias e fungos.

A maioria das proteases vegetais comerciais, tais como papaína, bromelina e ficina, são fáceis de se extrair, entretanto, o seu suprimento depende da demanda pelas matérias-primas de origem. Essas proteases apresentam uma produção sazonal que impossibilita um fornecimento estável, além do fato de as condições ambientais não serem reprodutíveis, o que pode resultar em qualidade não-uniforme dos extratos enzimáticos (LOFFLER, 1986).

Por motivos técnicos e econômicos, os microrganismos se apresentam como as fontes ideais de enzimas proteolíticas. Enzimas microbianas podem ser produzidas em grande

escala e por métodos de baixo custo. Os microrganismos apresentam um tempo curto de multiplicação, o que permite um fácil ajuste à demanda de mercado. Além disso, as condições ambientais podem ser rigidamente controladas de modo a se obter uniformidade na pureza, estabilidade e atividade enzimática dos preparados.

As enzimas proteolíticas são normalmente usadas pelas indústrias de panificação em forma de pó, tabletes e cápsulas. As enzimas em pó são adicionadas com os outros ingredientes secos, enquanto os tabletes são dissolvidos em água antes de serem incorporados à massa (LYONS, 1982).

As proteases mais usadas nas indústrias de panificação são as de origem fúngica e bacteriana. As proteases provenientes da cultura da bactéria Bacillus subtilis e do fungo Aspergillus oryzae são consideradas GRAS (Generally Recognized As Safe) pelo FDA (Food and Drug Administration) (LÖFFLER, 1986). Além disso, o seu uso em produtos de panificação é permitido pela legislação brasileira de alimentos (Resolução nº 24/76 do CBNPA).

3.5 - Determinação da Atividade Proteolítica de Preparados Enzimáticos

A determinação da atividade proteolítica de preparados enzimáticos é geralmente baseada em procedimentos viscosimétricos ou na quantificação dos produtos resultantes da proteólise de substratos susceptíveis, tais como gelatina, hemoglobina e caseína. Todos esses materiais são de origem animal e podem diferir acentuadamente das proteínas da farinha de trigo, tanto em quantidades relativas de aminoácidos quanto na estrutura física (JOHNSON & MILLER, 1953). Além disso, as modificações detectadas por esses métodos químicos refletem estágios mais

avancados da hidrólise da proteína, que estão além do ponto desejado de modificação reológica da massa pela ação proteolítica (POMERANZ et alii, 1966). Entretanto, isso não significa que se possa dispensar uma padronização analítica das proteases, pois essa é necessária para que se produzam preparados enzimáticos uniformes.

3.5.1 - Método da Hemoglobina

O método geralmente usado para dosar a atividade das enzimas proteolíticas de cereais é o método da hemoglobina de Ayre-Anderson, modificado por Miller e adotado como oficial pela Association of Official Analytical Chemists (PYLER, 1973). Nesse método, o substrato hemoglobina é digerido em pH 4,6 durante 5 horas, a 40 °C. A proteína não-digerida é precipitada com ácido tricloroacético, e o nitrogênio não-protéico solúvel é, então, determinado. Os resultados são expressos em unidades de hemoglobina por grama (HU/g).

Segundo PETIT (1974), embora o método de Ayre-Anderson seja usado para determinar a atividade proteolítica de preparados enzimáticos de origem fúngica e bacteriana para uso em panificação, o mesmo só apresenta resultados confiáveis e reprodutíveis quando aplicado às enzimas de cereais. Isso porque o método pressupõe que a relação entre $N^{3/2}$ e E (N = concentração de nitrogênio solúvel e E = concentração de enzima) é linear e que a reta representativa passa pela origem. Entretanto, esta última condição não foi satisfeita para as enzimas microbianas.

Foi mostrado que não existe relação entre a ação proteolítica de preparados enzimáticos na hemoglobina e no glúten de trigo isolado ou na massa. PETIT (1974) constatou que

preparados enzimáticos de origem fúngica e bacteriana, que apresentaram efeitos idênticos ou comparáveis sobre a molécula de hemoglobina, diferiram radicalmente quanto a seus efeitos na solubilização do glúten. POMERANZ *et alii* (1966) também observaram que, ao se adicionarem proteases de várias origens (tripsina, protease fúngica e bacteriana) nas massas de pão, em uma dose constante de 600 HU por 100 gramas de farinha, foram obtidos pães de volume e qualidade geral bastante diferentes.

3.5.2 - Método da Viscosidade da Gelatina

O princípio desse método se baseia no fato de que a viscosidade é uma função do comprimento das cadeias moleculares das proteínas em solução. A proteólise, quebrando as cadeias polipeptídicas, diminui a viscosidade. Nesse método proposto por Northrop, uma solução padrão de gelatina é tratada com a enzima de atividade desconhecida, e a mudança na viscosidade da solução é determinada, em pequenos intervalos, no viscosímetro Ostwald. Uma mudança na viscosidade específica de 1% por minuto é definida como uma unidade de atividade proteolítica. Os resultados obtidos com esse método não correspondem necessariamente à ação das proteases sobre as proteínas do glúten (PYLER, 1973).

3.5.3 - Método do Farinógrafo

Para contornar o problema dos dois métodos citados acima, JOHNSON & MILLER desenvolveram um método farinográfico para medir a atividade proteolítica de preparados enzimáticos em massas farinha-água em função do tempo. Eles observaram que a consistência dessas massas após 4 horas de descanso, seguidas de

15 minutos de mistura, foi proporcional à concentração da enzima proteolítica. Nesse procedimento, é necessário adicionar um excesso de α -amilase ou inativar essa enzima para uniformizar o seu efeito na consistência da massa (JOHNSON & MILLER, 1953; PYLER, 1973).

4 - Determinação da Proteólise na Massa através de Métodos Reológicos

Quando a farinha de trigo e os demais ingredientes da massa são homogeneizados durante a mistura, ocorre a hidratação das proteínas e a associação das mesmas através de pontes de hidrogênio, ligações de van der Waals e pontes S-S, formando um complexo reticular denominado glúten. O glúten se apresenta como uma rede de fibras elásticas que confere à massa a sua propriedade de extensibilidade sob pressão de um gás. Em panificação, as características reológicas das massas relacionadas com as proteínas do glúten são particularmente importantes, sendo responsáveis pelo volume e estrutura típica dos pães (BOBBIO, 1984).

Quando adicionadas às massas, as proteases apresentam ação hidrolítica sobre as proteínas do glúten, provocando um enfraquecimento da sua rede e, conseqüentemente, modificando as propriedades reológicas da massa. O efeito geral é uma redução na força elástica do glúten, de modo que a massa se torna mais flexível e extensível, facilitando o manuseio, o processamento, e fornecendo um produto final de melhor qualidade (PETIT & AUDIDIER, 1967).

O efeito das proteases na massa não pode ser determinado com precisão através dos métodos químicos de análise

que utilizam outros substratos como hemoglobina, gelatina ou caseína. Para se constatar a ação proteolítica na massa, são necessários métodos que mostrem uma variação das propriedades reológicas da mesma (PETIT & AUDIDIER, 1967; SPRÖBLER, 1981).

A influência das proteases nas propriedades viscoelásticas da massa pode ser estudada através do farinógrafo e extensógrafo Brabender e do alveógrafo Chopin. Com esses aparelhos e com testes de panificação, podem ser determinadas as dosagens ideais dessas enzimas para cada tipo de produto final (REED, 1967; GAMS, 1976).

4.1 - Farinógrafo Brabender

A utilização do farinógrafo Brabender como ferramenta para a interpretação quantitativa da proteólise na massa data da década de 30. Nesse aparelho, a resistência que a massa oferece ao movimento das pás na mistura gera um torque sobre o eixo das mesmas, que é registrado graficamente. O valor do torque em unidades arbitrárias (unidades farinográficas ou unidades Brabender) é definido como a consistência da massa.

LANDIS (1935) desenvolveu um método para determinar a atividade proteolítica de preparados comerciais através do farinógrafo, usando uma massa farinha-água de consistência uniforme como substrato padrão. Para isso, foi definida a energia de desenvolvimento da massa (unidades Brabender-minuto) como a área sob a curva farinográfica desde o início da mistura até o instante no qual a massa atinge a sua consistência máxima. Em seguida, foi medido o decréscimo da energia de desenvolvimento com o tempo, causado pela adição de enzima, em relação ao substrato padrão. Foi constatado que a taxa inicial de decréscimo da energia

de desenvolvimento com o tempo é proporcional à concentração de protease adicionada. Dessa forma, uma unidade de enzima proteolítica foi definida como aquela quantidade de enzima que, quando presente no substrato padrão, produzirá uma taxa inicial de decréscimo com o tempo da energia de desenvolvimento de 1000 unidades Brabender-minuto por hora. Conseqüentemente, o grau de atividade proteolítica de um preparado enzimático deve ser tomado como o número de unidades de enzima proteolítica por grama.

JOHNSON & MILLER (1953) utilizaram o farinógrafo para medir o efeito da proteólise na consistência de massas farinha-água com 4 horas de descanso. Nesse estudo, as massas foram misturadas durante 2 minutos no misturador Hobart A-200 e deixadas em repouso por 4 horas a 30°C. Após o descanso, uma porção da massa (530 g) foi transferida para o farinógrafo onde se registrou a consistência durante 15 minutos de mistura. A diminuição da consistência final da massa com protease em relação à massa-padrão (sem enzima) foi tomada como uma medida da atividade proteolítica.

PETIT & AUDIDIER (1967), usando o farinógrafo, registraram a variação da consistência de uma massa farinha-água diretamente durante a mistura em função da adição de doses crescentes de uma protease bacteriana (Bacillus subtilis). Os níveis de adição variaram de 9 a 135 HU por 100 g de farinha. Eles observaram que, apenas para as doses superiores a 45 HU por 100 g de farinha, foram registradas modificações perceptíveis na consistência das massas.

BERGER *et alii* (1974) realizaram um estudo semelhante, em que se registrou a consistência da massa diretamente durante a mistura no farinógrafo e não após um período de descanso. Foi usada uma protease comercial em níveis de adição

que variaram de 0 a 16.000 ppm em relação à farinha. Observou-se que, nas condições analisadas, a consistência máxima das massas não variou significativamente com a concentração de protease adicionada. Entretanto, a diferença entre a consistência máxima e a consistência após os 12 minutos de mistura seguintes apresentou uma correlação linear com as doses de enzima até 10.000 ppm.

Os resultados encontrados por PETIT & AUDIDIER (1967) estão de acordo com o estudo de DUCROO (1974) que também considerou a sensibilidade do farinógrafo insuficiente para colocar em evidência atividades proteolíticas fracas na massa. Entretanto, os efeitos nas características viscoelásticas da massa causados por uma proteólise branda podem ser muito importantes, notadamente na produção de pães a partir de farinhas fortes, que produzem massas elásticas e pouco extensíveis. Dessa forma, segundo DUCROO, o uso do farinógrafo não levou a uma solução perfeita para o problema de se relacionar atividade proteolítica e modificações observadas nas características da massa. Contudo, a facilidade de emprego torna esse aparelho apropriado ao estudo de atividades proteolíticas fortes, como é o caso da produção de certos tipos de biscoitos (DUCROO, 1974).

4.2 - Alveógrafo Chopin

De acordo com MONNIER & GODON (1975), o alveógrafo Chopin também pode ser usado para estudar o efeito da proteólise nas propriedades viscoelásticas da massa. Esse aparelho insufla ar sob uma massa em forma de disco e registra graficamente o trabalho de deformação. Com a introdução de ar, forma-se uma bolha de massa que aumenta de tamanho até o rompimento. Na curva obtida são definidos alguns parâmetros que representam a tenacidade da massa

(P), a elasticidade da massa (L) e a força da farinha (W). PETIT & AUDIDIER (1967) observaram que doses crescentes de proteases provocaram um decréscimo nos valores de P e W.

COLAS (1974) utilizou o alveógrafo Chopin para estudar a ação proteolítica de preparados enzimáticos comerciais usados na produção de pães. Através de testes preliminares com uma protease fúngica foi observado que, dentre os vários parâmetros alveográficos analisados, dois deles se mostraram mais sensíveis para avaliar as modificações provocadas na massa pela proteólise. O primeiro foi o índice de enfraquecimento em função do tempo de descanso, definido como $[(W_{20} - W_{180})/W_{20}] \times 100$, onde W_{20} e W_{180} representam a força da farinha após 20 e 180 minutos de descanso, respectivamente. O segundo parâmetro usado foi a diminuição relativa da força da farinha após 180 minutos de descanso, definido como $[(W_{T180} - W_{P180})/W_{T180}] \times 100$, onde W_{T180} e W_{P180} representam a força da farinha após 180 minutos de descanso para a massa sem protease e com protease, respectivamente. Usando-se doses crescentes de proteases de diferentes origens foram encontrados valores também crescentes para esses dois parâmetros. Através de testes de panificação, foi estabelecido que as farinhas para pão tratadas com proteases podem suportar valores máximos de 50% para o índice de enfraquecimento e para a diminuição relativa da força da farinha, sem prejuízo do volume e da qualidade final dos pães.

BERGER et alii (1974) propuseram um método para determinar a atividade proteolítica de preparados enzimáticos comerciais usando o alveógrafo Chopin. Primeiramente, foram definidos dois parâmetros que representam a tenacidade da massa a partir das curvas alveográficas, sendo eles P_m = pressão máxima e P_2 = pressão a dois centímetros da origem. Foi observada uma

relação linear do tipo $y = ax + b$ entre as grandezas P_2/P_m (y) e a quantidade em gramas de protease por 250 gramas de farinha (x). Embora o valor de b dependa da farinha usada, o valor de a é aproximadamente constante para um determinado preparado enzimático. Este último valor foi, então, tomado como uma medida da atividade proteolítica do preparado. Comparando esses resultados com aqueles descritos anteriormente para o farinógrafo, BERGER et alii (1974) concluíram que o alveógrafo deve ser preferido ao farinógrafo, devido à natureza das informações fornecidas e à confiabilidade dos resultados, tanto no que se refere à repetibilidade quanto à reprodutibilidade dos mesmos em laboratórios distintos.

4.3 - Extensógrafo Brabender

A adição de proteases torna as massas mais macias e provoca modificações na elasticidade e na extensibilidade das mesmas. Estas características podem ser determinadas graficamente através do extensógrafo Brabender, que registra a resistência oferecida pela massa ao esticamento. Portanto, esse aparelho também permite o acompanhamento das modificações reológicas da massa causadas pela proteólise. Em geral, doses crescentes de enzimas proteolíticas provocam uma diminuição da resistência à extensão (elasticidade) e um aumento da extensibilidade das massas (UHLIG & SPRÖBLER, 1972; HASEBORG, 1981).

POMERANZ et alii (1966) usaram o extensógrafo para estudar a ação de proteases fúngicas do Aspergillus niger e Aspergillus oryzae, da protease bacteriana do Streptomyces griseus e da tripsina. Essas enzimas foram adicionadas em uma dose constante de 600 HU (unidades de hemoglobina) por 100 gramas de

farinha em massas farinha-água. Foi observado que a ação das proteases fúngicas e da tripsina provocou um decréscimo da área sob a curva extensográfica, o que mostra um enfraquecimento da massa. Com a protease bacteriana, a estrutura da massa foi drasticamente destruída.

SPROBLER (1981) estudou o efeito da adição de doses crescentes de proteases de origem vegetal (papaina), bacteriana (Bacillus subtilis) e fúngica na resistência à extensão de massas farinha-água registrada no extensógrafo. Variando-se a concentração de protease fúngica de 0 a 25 HU por 100 gramas de farinha, a resistência à extensão diminuiu de 600 a 350 unidades extensográficas (UE). Por outro lado, ao se variar a concentração de papaina e de protease bacteriana de 0 a 5 HU por 100 gramas de farinha, a resistência à extensão diminuiu de 600 a um valor inferior a 100 UE. Esses resultados confirmam a ausência de correlação entre os efeitos de proteases de diferentes fontes sobre a hemoglobina e sobre o glúten na massa.

5 - Efeito das Proteases no Processamento de Pães e Biscoitos

A adição de proteases exógenas visando ao enfraquecimento do glúten deve ser feita em função da qualidade da farinha utilizada e do produto desejado. Na produção de pães a partir de farinhas fortes, as massas com alta elasticidade e pouca maleabilidade no manuseio podem ser melhoradas com uma proteólise branda. Por outro lado, na produção de biscoitos e "crackers", a rede de proteína (glúten) deve ser suficientemente enfraquecida para facilitar o processamento e fornecer um produto friável, o que pode ser alcançado através de uma ação proteolítica mais forte do que aquela para a produção de pães (MONNIER & GODON, 1975).

6.1 - Proteases no Processamento de Pães

A adição de proteases na produção de pães pode apresentar efeitos benéficos quando são usadas farinhas fortes de alto teor protéico em processos convencionais ou no caso dos métodos contínuos de panificação, que requerem tempos de mistura curtos e massas mais flexíveis e maleáveis para o processamento (DIAZ, 1988).

A utilização de farinhas muito fortes leva à formação de massas duras, difíceis de serem manuseadas e que produzem pães de pequeno volume e baixa qualidade. Com a adição de proteases que hidrolisam as cadeias protéicas do glúten, a extensibilidade das massas é aumentada juntamente com a capacidade de retenção de gás. Em geral, massas com maior extensibilidade permitem um manuseio mais fácil (melhor maquinabilidade), fornecendo pães de maior volume e melhores simetria, textura e granulosidade do miolo (UHLIG & SPRÖBLER, 1971; GAMS, 1976). Tradicionalmente, essas características dos pães eram obtidas aumentando-se os tempos de mistura e/ou de fermentação das massas. Atualmente, o uso de proteases tem permitido a produção de pães de boa qualidade com maior rapidez e melhor controle do processo (BARRETT, 1975). Segundo COLE (1973), pode-se reduzir em até 30% o tempo de mistura da massa, sem prejudicar a qualidade do produto final.

A adição de proteases no processamento de pães é uma prática amplamente empregada em países que produzem, principalmente, variedades de trigos fortes. Esse é o caso de alguns países da Europa e também dos Estados Unidos, onde as proteases de origem fúngica são as mais comumente utilizadas no processamento de pães (MONNIER & GODON, 1975; LYONS, 1982). O uso

dessas enzimas vem assumindo maior importância em relação à adição de amilases. Isso porque a farinha de trigo contém uma certa quantidade de α -amilase natural e outras fontes dessa enzima são prontamente disponíveis. Por outro lado, as proteases naturais da farinha não são ativas no pH normal das massas e, conseqüentemente, não desempenham nenhum papel em panificação. Dessa forma, a suplementação da atividade proteolítica deve ser feita através de proteases de outras fontes. Além disso, os métodos contínuos de produção de pães requerem rígido controle dos tempos de mistura e produção de massas com ótima maquinabilidade, o que vem sendo alcançado através da adição de proteases no pré-fermento. Nos Estados Unidos, estima-se que aproximadamente 2/3 da produção total de pães é feita com proteases fúngicas do Aspergillus oryzae (BARRETT, 1975).

Além da ação direta no condicionamento da massa para o processamento, as proteases também podem influenciar as propriedades organolépticas dos pães produzidos. A hidrólise enzimática das proteínas da farinha leva à formação de grupos NH_2 e COOH . Os grupos NH_2 assim liberados podem reagir com os açúcares redutores presentes na formulação, ou produzidos pela ação da α -amilase, para dar a conhecida reação de Maillard, que é responsável pelo escurecimento da crosta e pela formação dos aromas característicos do pão (CHASEBORG, 1981; LYONS, 1982).

EL DASH & JOHNSON (1967) estudaram a influência da adição de enzimas proteolíticas de origem fúngica e vegetal (papaina) no aroma e no gosto dos pães. Eles observaram que o aroma é melhorado pelo uso de proteases, o que pode ser atribuído a um aumento na formação de compostos carbonílicos, causado pela ação enzimática. Entretanto, não foram detectadas alterações no gosto dos pães.

Nem todas as proteases são igualmente adequadas à produção de pães. Pequenas doses de protease de origem bacteriana e vegetal, como papaína e bromelina, podem provocar uma hidrólise excessiva do glúten, tornando a massa altamente extensível, pegajosa e com péssimas características para o processamento. Essas enzimas não são recomendadas para pães, devido ao perigo de dosagem excessiva. Por outro lado, a ação mais fraca das proteases fúngicas na massa sugere o seu emprego no tratamento de farinhas fortes para pães. As proteases fúngicas causam um efeito de amolecimento perceptível na massa, tornando-a mais flexível e facilitando o seu manuseio. A maior flexibilidade de dosagem dessas enzimas é vantajosa, uma vez que diminui consideravelmente o risco de "overdose" (DUCROO, 1974; SPRÖBLER, 1981).

A maioria das proteases fúngicas usadas em panificação são derivadas do Aspergillus oryzae (BARRETT, 1975). Normalmente, os preparados de protease fúngica contêm alguma atividade amilolítica, que também deve ser padronizada para um maior controle da aplicação dessas enzimas. De um modo geral, as proteases fúngicas são misturas de endo e exopeptidases com pH ótimo na faixa de 4,3 a 5 e temperatura ótima variando entre 30 e 50°C (LYONS, 1982). Essas enzimas são comumente usadas em níveis de adição de aproximadamente 50.000 a 100.000 HU por 50 kg de farinha (COLE, 1973).

5.2 - Proteases no Processamento de Biscoitos

As proteases também podem ser usadas com sucesso na produção de biscoitos doces, "crackers" e "waffles".

A adição de proteases é particularmente benéfica na produção de "crackers", onde é necessária uma massa mole e

extensível para controlar a textura e o volume do produto (FOX & MULVIHILL, 1982). Essas enzimas agem sobre o glúten durante o longo período de fermentação para fornecer um balanço adequado entre extensibilidade e elasticidade das massas. Isso permite que as mesmas sejam finamente laminadas sem se romperem e produzam no cozimento biscoitos com uma superfície lisa, sem bolhas ou deformações nas bordas (BARRETT, 1975). O uso de proteases pode também acelerar o condicionamento do glúten durante a fermentação. No processo normal de produção de "crackers", o estágio-esponja envolve uma fermentação de 18 horas e o estágio-massa consome mais 4 horas. Com a adição de proteases, o tempo de fermentação da esponja pode ser bastante reduzido, o que aumenta a produção (VITTI, 1988).

As proteases exercem um papel importante na produção de "waffles". Para esse tipo de produto, devem ser produzidas massas fluidas de baixa viscosidade, que possam ser bombeadas durante o processamento. Para isso é preciso usar grandes quantidades de água na formulação. A viscosidade da suspensão pode também ser reduzida através da degradação do glúten pelas proteases, o que diminui a quantidade de água necessária. Consequentemente, serão reduzidos os gastos de energia com a evaporação de água no cozimento. O tempo de cozimento também será reduzido, aumentando-se, dessa forma, a capacidade de produção (CHASEBORG, 1981; SPROBLER, 1981).

O uso de proteases pode ser de grande valia no processamento de biscoitos semidoces duros. Existem regras particulares que orientam a produção desse tipo de biscoito. Primeiramente, devem ser usadas farinhas de trigo de baixo teor de proteínas. Deve-se, também, limitar ao máximo o inchamento das partículas protéicas durante a mistura da massa. Essa é a razão de

se reduzir, ao mínimo, o grau de hidratação da massa, através da adição de açúcares e de outros ingredientes secos que absorvem uma parte da água disponível. Finalmente, deve-se evitar a formação de uma rede de glúten forte, para que sejam produzidas massas facilmente moldáveis e para assegurar ao produto final uma boa friabilidade. Dessa forma, o objetivo da mistura da massa é promover a homogeneização dos ingredientes com um mínimo de desenvolvimento do glúten, devendo ser, portanto, realizada a baixas velocidades (GUÉRIVIÈRE e BUSSIÈRE, 1974).

Massas produzidas com farinhas fortes são frequentemente elásticas e curtas, tendendo a voltar à sua forma original, quando esticadas. Os biscoitos feitos com essas massas apresentam problemas de laminação, tornando-se duros e pesados e apresentando bolhas na superfície, após o cozimento. O condicionamento da massa através da adição de proteases permite reduzir ou remover os efeitos negativos causados pela retração da massa na laminação, um fenômeno intimamente relacionado à presença de um excesso de proteínas na farinha de trigo. O uso dessas enzimas possibilita, portanto, a utilização de farinhas inicialmente inadequadas à produção de biscoitos, permitindo aos tecnólogos controlar as características dimensionais dos produtos que fabricam. Além disso, a adição de proteases pode levar a uma redução do tempo de mistura necessário para o desenvolvimento da massa (GAMS, 1976).

Os efeitos das proteases nas propriedades plásticas do glúten são encontrados na textura do produto final. A dispersão ou o enfraquecimento da rede de proteínas na massa pelas proteases possibilita a formação de um produto mais friável, de menor densidade e dureza e de melhor aparência geral (MONNIER & GODON, 1975).

Além da textura, as proteases também podem agir na cor e nas propriedades organolépticas dos biscoitos, de forma análoga ao que foi apresentado para pães (CHASEBORG, 1981; LYONS, 1982).

De um modo geral, as proteases de origem bacteriana e vegetal, como papaína e bromelina, são consideradas mais adequadas ao processamento de biscoitos em relação às fúngicas, por apresentarem maior eficácia na degradação do glúten (SPRÖBLER, 1981). As proteases bacterianas são concentrados enzimáticos derivados do Bacillus subtilis, apresentando pH ótimo de ação na faixa de 6 a 7 e temperatura ótima próxima de 50°C (LYONS, 1982).

III - MATERIAL E MÉTODOS

A - MATERIAL

1 - Matéria-prima

Nesta pesquisa foram usadas duas farinhas de trigo comerciais do tipo comum. Uma delas foi utilizada nos testes laboratoriais de produção de biscoitos (farinha I) e a outra nos testes realizados em escala industrial na Companhia Campineira de Alimentos (farinha II).

2 - Reagentes e Ingredientes

2.1 - Reagentes

Os reagentes utilizados nas determinações químicas foram todos de pureza analítica.

As enzimas utilizadas foram uma protease fúngica e outra bacteriana, fornecidas pela Miles do Brasil Ltda. A protease bacteriana é conhecida comercialmente como "HT-Proteolytic". A protease fúngica e a bacteriana são produzidas através de fermentação submersa de cepas de Aspergillus oryzae e Bacillus subtilis e possuem uma atividade de 1300 U/g e 200 NU/g, respectivamente. De acordo com as especificações desta indústria, 1 U (Unit) é definida como a atividade proteolítica que aumenta de 1 a absorbância da caseína do leite a 660 nm nas condições-padrão da indústria. Da mesma forma, 1 NU (Northrop Unit) é a quantidade de enzima que provoca 40% de hidrólise de um litro de caseína em

60 minutos, nas condições de reação padronizadas pela Miles do Brasil Ltda.

2.2 - Ingredientes

Na produção dos biscoitos semidoces duros foram usados os seguintes ingredientes:

- amido de milho
- açúcar cristal
- açúcar invertido
- gordura vegetal hidrogenada
- sal
- leite em pó integral
- bicarbonato de sódio
- bicarbonato de amônio
- ácido cítrico
- ácido láctico
- essência líquida de baunilha
- lecitina de soja
- bissulfito de sódio comercial

3 - Aparelhos e Equipamentos

3.1 - Testes Laboratoriais

Na caracterização das farinhas de trigo, no estudo das características reológicas das massas e na produção laboratorial dos biscoitos, foram utilizados os seguintes aparelhos e equipamentos:

- balança analítica Bosch, modelo S 2000
- balança semi-analítica Mettler, modelo P 1200
- mufla Forlabo
- estufa com circulação de ar Fanen, modelo 320-SE
- digestor de proteínas
- destilador de proteínas Tecnal, modelo TE-036
- planímetro Maho
- potenciômetro Metrohm Herisau, modelo E 512
- desseccador
- farinógrafo Brabender, modelo 810101
- extensógrafo Brabender, modelo 860000
- modeladora Siam-Util
- laminador manual (dois rolos de metal paralelos separados por uma distância ajustável)
- forno elétrico Imequi, série 8/88
- cabine e boleadora do extensógrafo
- liquidificador Britânia-L-
- agitador magnético Marconi, modelo TE 085

3.2 - Testes Industriais

No processamento e caracterização dos biscoitos em escala industrial, foram utilizados os seguintes equipamentos:

- misturador vertical Siam-Util
- sistema de laminação e corte Simon Vicars
- forno contínuo Simon Vicars
- esteiras de lona para resfriamento
- sistema de embalagem Otto Hansel
- balança semi-analítica Marte, modelo 1001

- potenciômetro Micronal, modelo B 221
- balança automática determinadora de umidade Ohaus, modelo 5010
- dispositivo para medir a espessura dos biscoitos, fabricado pela indústria.

B - MÉTODOS

1 - Caracterização das Farinhas de Trigo

1.1 - Testes Químicos

- Proteína: segundo AACC, método 46-11 (AACC, 1969)
- Cinzas: segundo AACC, método 08-01 (AACC, 1969)
- Lipídios: segundo método de Bligh & Dyer (Bligh & Dyer, 1959)
- Umidade: segundo AACC, método 44-15a (AACC, 1969)

1.2 - Testes Físico-Químicos

- pH: segundo AACC, método 02-52 (AACC, 1969)
- Conteúdo de glúten: segundo AACC, método 38-10 (AACC, 1969)

1.3 - Testes Reológicos

- Farinógrafo Brabender: segundo AACC, método 54-21 (AACC, 1969)

Os parâmetros farinográficos determinados foram:

1) Absorção de água, definida como a quantidade de água necessária para o centro da curva atingir a linha de 500 unidades farinográficas (UF).

2) Tempo de chegada, definido como o tempo em minutos necessário para que o topo da curva atinja a linha de 500 UF, após a adição de água.

3) Tempo de desenvolvimento, definido como o tempo em minutos desde o início da mistura até o desenvolvimento máximo da curva, imediatamente antes da primeira indicação de queda.

4) Estabilidade, definida como a diferença de tempo em minutos entre o ponto onde o topo da curva intercepta a linha de 500 UF e o ponto onde o topo da curva deixa a linha de 500 UF.

5) Índice de tolerância, definido como a diferença em unidades farinográficas entre o valor no topo da curva no pico e o valor no topo da curva medido 5 minutos após o pico ser alcançado.

* Extensógrafo Brabender: segundo AACC, método 54-10 (AACC, 1969)

Os parâmetros extensográficos determinados foram:

1) Resistência à extensão (RE), definida como o valor da curva em unidades extensográficas obtido a 50 mm da origem.

2) Resistência máxima (RM), definida como o valor em unidades extensográficas obtido no ponto mais alto da curva.

3) Extensibilidade (E), definida como o comprimento da curva, do início ao fim, em mm.

4) Número proporcional (RE/E), definido como a razão entre a resistência à extensão e a extensibilidade.

5) Energia (A), definida como a área abaixo da curva em cm^2 .

2 - Processamento dos Biscoitos Semidoces Duros em Laboratório

2.1 - Formulação Padrão

* farinha de trigo	200 g	(100 %)
* amido de milho	20 g	(10 %)
* açúcar cristal	30 g	(15 %)
* açúcar invertido	40 g	(20 %)
* gordura	46 g	(23 %)
* água	50 g	(25 %)

• sal	1,6 g	(0,8 %)
• bicarbonato de sódio	2 g	(1 %)
• bicarbonato de amônio	1,6 g	(0,8 %)
• essência	0,4 g	(0,2 %)
• lecitina de soja	0,4 g	(0,2 %)
• ácido cítrico	0,3 g	(0,15 %)
• leite em pó integral	8 g	(4 %)
• bissulfito de sódio	0,2 g	(1000 ppm)

No estudo da proteólise na massa de biscoito, foram adicionadas proteases de origem fúngica ou bacteriana em substituição ao bissulfito de sódio. Os demais ingredientes da formulação acima não foram alterados. As proteases foram dosadas em ppm em relação à farinha, e os níveis de adição foram especificados em cada experimento realizado.

Com base nos resultados obtidos no estudo dos fatores que afetam a proteólise na massa, foram estabelecidas as concentrações de protease bacteriana e as condições de processamento a serem usadas na produção de biscoitos em laboratório.

2.2 - Mistura

A mistura da massa foi conduzida no misturador do farinógrafo a 31,5 rpm, durante 30 minutos, à temperatura constante de 33 ou 38°C, conforme o experimento. Antes de ser adicionada à massa, a gordura pesada em béquer foi fundida em manta térmica até atingir 45 °C. Os demais ingredientes foram usados à temperatura ambiente. Parte da água da formulação foi

usada para a dissolução prévia da protease ou do bissulfito de sódio, de acordo com o experimento. Todos os ingredientes foram adicionados antes de se ligar o misturador. Assim que a massa começou a se formar, as paredes internas do misturador foram raspadas com espátula e o mesmo foi coberto durante a mistura.

2.3 - Descanso

Em alguns testes foi introduzida uma etapa de descanso da massa por um período de 30 minutos após a sua mistura. Nesta etapa, a massa foi colocada na cabine do extensógrafo, mantida na mesma temperatura de mistura.

2.4 - Laminação

Após a mistura ou descanso, dois pedaços de massa de aproximadamente 150 g foram cortados e depois arredondados na boleadora do extensógrafo. Em seguida, as massas boleadas foram laminadas manualmente, usando-se um rolo de madeira. Essas massas foram novamente laminadas com o auxílio de um laminador manual, ajustando-se a espessura final da massa a um valor de aproximadamente 2 mm.

2.5 - Corte

A massa laminada foi cortada em discos com o auxílio de um molde cilíndrico oco de 4,5 cm de diâmetro. Esse dispositivo foi pressionado perpendicularmente à superfície da massa, formando discos de mesmo diâmetro. Usando-se uma pequena

base circular de madeira provida de pregos, foram feitos pequenos orifícios nos biscoitos crus.

2.6 - Cozimento

Os biscoitos laminados e cortados foram colocados em formas metálicas forradas com papel de alumínio. O cozimento foi feito em forno elétrico à temperatura de 250 ± 5 °C durante 4 minutos.

2.7 - Resfriamento

Após o cozimento, os biscoitos foram resfriados à temperatura ambiente.

3 - Caracterização das Massas de Biscoito Semidoce Duro

As massas de biscoito foram caracterizadas através de parâmetros reológicos, determinados no farinógrafo e no extensógrafo, e da determinação do pH.

3.1 - Determinação das Características Reológicas

Para as concentrações de protease bacteriana ou fúngica usadas, e também para o bissulfito de sódio, foram produzidas massas em duplicata, de acordo com a formulação descrita no item 2.1. A mistura das massas foi realizada segundo o item 2.2. Os valores médios dos parâmetros reológicos determinados (consistência final, resistência à extensão, resistência máxima e

extensibilidade) foram usados na análise dos resultados. Foram elaborados gráficos relacionando a concentração de protease com a consistência final de mistura, resistência à extensão e resistência máxima das massas. Para esses gráficos foi feito um ajuste de curvas baseado no método dos mínimos quadrados. Em cada caso foi escolhida a curva que forneceu o melhor coeficiente de correlação (r). Valores desse coeficiente próximos de ± 1 indicam um bom ajuste da curva aos dados experimentais.

3.1.1 - Utilização do Farinógrafo Brabender

Através do farinógrafo foi registrada graficamente a consistência da massa durante o processo de mistura. Na curva farinográfica, foi determinado o valor da consistência final em unidades farinográficas (UF) obtido após o período total de mistura de 30 minutos. O desvio-padrão do método de determinação da consistência final foi estimado de acordo com o item 8.1.

3.1.2 - Utilização do Extensógrafo Brabender

Imediatamente após a mistura no farinógrafo, dois pedaços de massa de $150,0 \pm 0,1$ g foram cortados e depois arredondados na boleadora do extensógrafo. As massas boleadas foram, em seguida, transformadas em pequenos cilindros na modeladora Siam-Util. Esses cilindros de massa foram colocados em formas apropriadas do aparelho e procedeu-se à obtenção das curvas extensográficas. Cada massa misturada no farinógrafo forneceu, portanto, duas curvas extensográficas. Como as massas foram preparadas em duplicata, obtiveram-se ao final quatro curvas

extensográficas.

Nos experimentos em que se estudou o efeito do tempo de descanso na proteólise, as massas foram colocadas (depois de boleadas e moldadas) em cabines, na mesma temperatura de mistura de 33 ou 38°C, por um período de 30 minutos. Imediatamente após o descanso, foram traçadas as curvas extensográficas.

Nas curvas extensográficas, foram determinados os parâmetros extensibilidade em mm, resistência à extensão e resistência máxima em unidades extensográficas (UE), que foram definidos no item 1.3. Os desvios-padrão dos métodos de determinação da resistência à extensão, da resistência máxima e da extensibilidade das massas foram estimados de acordo com o item 8.1.

3.2 - Determinação do pH

Nos experimentos em que se determinou o pH da massa, o teste foi realizado após a mistura no farinógrafo. Foram triturados 30 g de massa em 100 ml de água destilada no liquidificador (Britânia- 1 minuto - posição 1). A suspensão e o resíduo de lavagem do material com mais 100 ml de água destilada foram colocados num béquer de 500 ml e submetidos à agitação mecânica (agitador magnético). Em seguida, foi feita a leitura do pH. As determinações de pH foram realizadas em duplicata.

4 - Estudo dos Fatores que Afetam a Proteólise nas Massas de Biscoito Semidoce Duro

Foram estudados alguns fatores que influenciam a proteólise na massa, tais como origem da enzima (fúngica ou bacteriana), tempo de descanso, pH e temperatura.

4.1 - Escolha dos Parâmetros Reológicos para a Determinação da Proteólise nas Massas

Com o objetivo de se determinarem os parâmetros reológicos adequados ao estudo dos fatores que afetam a proteólise nas massas de biscoito, foram realizados ensaios preliminares no farinógrafo e no extensógrafo.

Foram preparadas massas de biscoito com protease bacteriana à temperatura de mistura de 33°C e sem descanso. Os níveis de adição de protease variaram de 400 a 1100 ppm, em intervalos iguais de 100 unidades. Foram também preparadas massas-padrão, ou seja, com adição de bissulfito de sódio, à temperatura de 33°C e sem descanso. Além disso, nessa etapa foram preparadas massas sem aditivo (protease ou bissulfito), nas mesmas condições das anteriores.

As características farinográficas e extensográficas das massas foram determinadas conforme os itens 3.1.1 e 3.1.2, usando-se as características das massas-padrão e das massas sem aditivo como referência para a comparação dos resultados. A variação dos parâmetros farinográficos e extensográficos determinados, em função de níveis crescentes de adição de protease, foi tomada como indicador da intensidade da proteólise

na massa.

4.2 - Efeito da Adição de Proteases de Origem Fúngica e Bacteriana nas Massas

Foram preparadas massas com proteases à temperatura de 33°C e sem descanso. Os níveis de adição de protease bacteriana e fúngica variaram de 400 a 1100 ppm, em intervalos iguais de 100 unidades, e de 1000 a 5000 ppm, em intervalos eqüidistantes de 1000 unidades, respectivamente.

A determinação das características extensográficas das massas foi realizada segundo o item 3.1.2.

4.3 - Efeito do Tempo de Descanso das Massas na Proteólise

Foram preparadas massas com protease bacteriana à temperatura de 33°C. Os níveis de adição de protease variaram de 400 a 1100 ppm, em intervalos iguais de 100 unidades, para as massas sem descanso, e de 300 a 1000 ppm, com o mesmo passo, para as massas com descanso de 30 minutos.

A determinação das características extensográficas das massas foi realizada de acordo com o item 3.1.2.

4.4 - Efeito do pH das Massas na Proteólise

Foram preparadas massas com 800 ppm de protease bacteriana à temperatura de 33°C e com descanso de 30 minutos. A variação do pH das massas foi obtida adicionando-se quantidades crescentes de ácido láctico p. a. (1,0; 2,0 e 2,5 ml) ou

bicarbonato de sódio p. a. (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g) juntamente com os demais ingredientes, antes de se iniciar a mistura da massa.

As determinações das características extensográficas e do pH das massas foram conduzidas segundo os itens 3.1.2 e 3.2, respectivamente.

4.5 - Efeito da Temperatura das Massas na Proteólise

Foram preparadas massas com protease bacteriana em níveis de adição que variaram de 300 a 1000 ppm em intervalos iguais de 100 unidades para as massas com temperatura de mistura e descanso de 33 °C, e de 100 a 900 ppm com o mesmo passo para as massas com temperatura de mistura e descanso de 38 °C.

A determinação das características extensográficas foi realizada de acordo com o item 3.1.2.

5 - Caracterização dos Biscoitos Produzidos em Laboratório

Os biscoitos foram caracterizados através de testes físicos, físico-químicos e sensoriais.

5.1 - Determinação do pH

Para se determinar o pH, utilizou-se o método adotado pela "Campineira" e adaptado das normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1976). Foram pesados 10 g de biscoito previamente triturado em um béquer de 250 ml. Em seguida, foram adicionados 150 ml de água destilada e a mistura

foi submetida à agitação mecânica (agitador magnético) durante 5 minutos. A suspensão resultante foi deixada em repouso por 10 minutos para decantar, com subsequente leitura do pH do sobrenadante. As determinações de pH foram feitas em triplicata.

5.2 - Determinação da Umidade

A amostra de biscoito foi triturada no almofariz até ser reduzida a uma farinha fina. A umidade foi determinada segundo AACC, método 44-15a (AACC, 1960), em triplicata.

5.3 - Medidas Físicas

As medidas físicas foram efetuadas em quatro conjuntos de 10 biscoitos, obtendo-se, dessa forma, quatro valores para cada um dos parâmetros listados abaixo:

1 - Massa dos biscoitos crus (g)

2 - Massa dos biscoitos cozidos e resfriados (g)

As perdas ponderais (%) no cozimento e resfriamento foram calculadas considerando-se a variação percentual da massa dos biscoitos cozidos e resfriados em relação à massa dos biscoitos crus.

3 - Comprimento médio dos biscoitos (cm)

Para calcular o comprimento médio de 10 biscoitos foram realizadas duas medidas de comprimento com o auxílio de uma régua. Uma das medidas corresponde ao maior comprimento dos 10 biscoitos dispostos lado a lado. Em seguida, foi feito um giro de 90° em todos os biscoitos, medindo-se, dessa forma, o menor comprimento dos mesmos. O comprimento médio (L_m) foi calculado

como a média aritmética desses dois valores. Isso foi necessário devido a uma tendência de ovalização dos biscoitos provocada pelo manuseio nas operações de laminação e corte.

A regularidade de forma foi definida como a razão entre o maior e o menor comprimento de cada conjunto de 10 biscoitos. Assim sendo, uma regularidade perfeita corresponde ao valor 1.

4 - Espessura dos biscoitos (cm)

O fator de expansão é definido como a razão entre o comprimento e a espessura dos biscoitos (medida com uma régua) e foi calculado usando-se o comprimento médio (L_m).

5 - Volume dos biscoitos (cm^3)

O volume dos biscoitos foi determinado por deslocamento de sementes de painço. Foram realizadas no mínimo 4 medidas de volume para cada conjunto de 10 biscoitos e tomou-se o valor médio dessas medidas como o volume do conjunto. O desvio-padrão desse método foi estimado de acordo com o item 8.3.

A densidade (g/cm^3) foi calculada como a razão entre a massa dos biscoitos cozidos e resfriados e o seu volume.

Os parâmetros determinados foram avaliados de acordo com a análise estatística descrita no item 8.4.

5.4 - Avaliação da Qualidade

Os biscoitos foram avaliados no laboratório através de notas atribuídas às seguintes características: forma (10 pontos), crocância (30 pontos), cor (15 pontos), sabor (30 pontos) e aroma (15 pontos), num total de 100 pontos.

6 - Processamento dos Biscoitos Semidoces Duros na Indústria

6.1 - Formulação

A formulação usada nos testes industriais foi a mesma empregada nos experimentos realizados em laboratório e apresentada no item 2.1, com exceção dos teores de água e de bissulfito de sódio. Para a massa-padrão, a concentração de água foi reduzida de 25 para 22,5% e a de bissulfito de sódio de 1000 para 500 ppm em relação à farinha de trigo. As massas com protease bacteriana foram produzidas com adição de 800 ppm da enzima para o tratamento sem descanso e de 700 ppm para o tratamento com 30 minutos de descanso, mantendo-se o teor de água em 22,5%. Para cada batelada de massa produzida foram usados 200 kg de farinha de trigo.

6.2 - Mistura

A mistura da massa foi feita em misturador vertical de dois braços e com capacidade de aproximadamente 400 kg de massa. A velocidade de rotação foi de 25 rpm e o tempo de mistura de 30 minutos, para todos os experimentos. Parte da água da formulação foi usada para a dissolução prévia da protease ou do bissulfito de sódio, de acordo com o experimento. A gordura e o açúcar invertido foram aquecidos e armazenados em tanques antes de serem incorporados à massa. As temperaturas de adição desses ingredientes e da água foram registradas em cada teste realizado. Os demais ingredientes foram usados à temperatura ambiente. Todos os ingredientes foram adicionados antes de se ligar o misturador.

Na etapa de mistura foi realizado um controle de temperatura da massa ao longo dos 30 minutos, registrando-se a temperatura de 5 em 5 minutos, a partir dos primeiros 5 minutos de mistura.

Foram realizados testes preliminares para adaptar às condições industriais a temperatura de mistura e as concentrações de bissulfito de sódio, água e protease, que foram previamente estabelecidas nos testes laboratoriais. Essas modificações foram necessárias para a obtenção de massas com características elásticas adequadas à laminação, avaliadas manualmente pelo encarregado da seção de mistura da indústria. Uma vez estabelecidos os ajustes na formulação do biscoito, em função das condições encontradas na indústria, foram preparadas duas bateladas de massa de 400 kg cada, denominadas massas 1 e 2.

Após a mistura da massa, inclusive nos experimentos em que se introduziu um período de descanso, foram coletadas amostras para a determinação do pH da massa. O teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.

6.3 - Descanso

Nos testes em que se introduziu um período de descanso de 30 minutos após a mistura, a massa foi deixada em repouso à temperatura ambiente. Durante o descanso, a temperatura da massa também foi registrada em intervalos de 5 minutos.

6.4 - Laminação

Após a mistura ou o descanso, a massa foi conduzida para o sistema de laminação através de um mecanismo de alimentação

que inclui rolos pré-laminadores. O sistema de laminação propriamente dito é formado por três pares de rolos laminadores seguidos por um formador de dobras e mais três pares de rolos calibradores ou redutores, conforme o esquema apresentado na figura 2. Após a primeira etapa de laminação e a formação das camadas, os três pares de rolos calibradores finais reduziram a espessura da massa a aproximadamente 1,5 mm. A massa laminada foi, então, estampada e cortada.

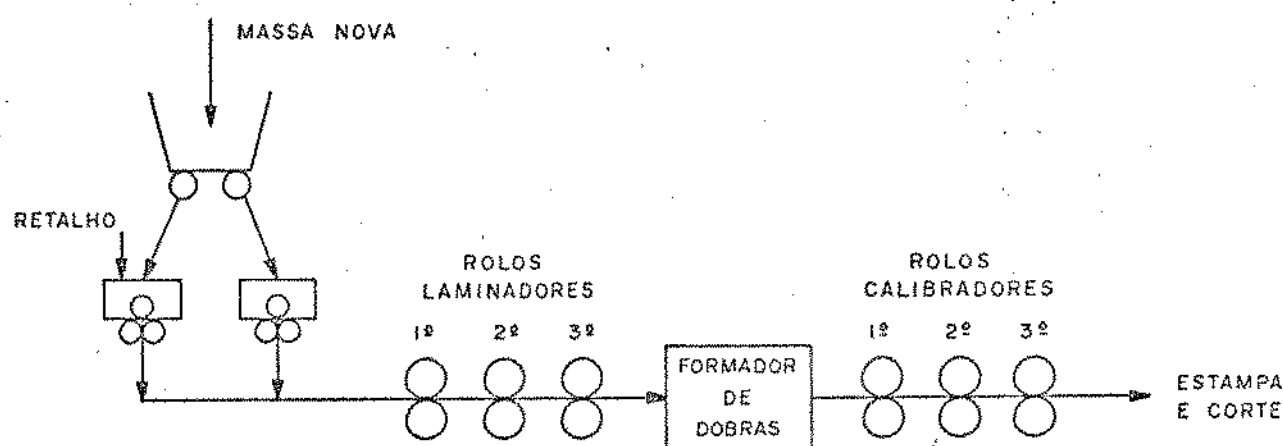


Figura 2 - Esquema do sistema de laminação industrial

6.5 - Estampa e Corte

Após a laminação, a massa foi conduzida para o sistema de formação dos biscoitos, constituído por dois rolos consecutivos. O primeiro rolo imprime na massa o formato do biscoito e o segundo separa as unidades do restante da massa. Nessa etapa, ocorre o aparecimento de retalho, que é recirculado para o sistema de alimentação, sendo, então, reprocessado juntamente com massa nova. Os biscoitos produzidos foram do tipo

"Maizena", com formato retangular e bordas arredondadas.

Para se controlar o processo de laminação e formação, os biscoitos crus foram pesados em número de dez. Para os biscoitos "Maizena", a massa de dez biscoitos crus deve estar entre 53 e 54 g, o que foi obtido após ajustes no terceiro par de rolos calibradores.

6.6 - Cozimento

Os biscoitos formados foram cozidos em forno contínuo do tipo túnel com esteira metálica. O forno usado tem 80 m de comprimento por 1,2 m de largura e é formado por oito zonas de aquecimento com controle independente de temperatura. As duas primeiras zonas têm aquecimento a gás e as seis restantes a óleo. As temperaturas dessas zonas são usualmente as seguintes:

1ª zona: $T_{\text{teto}} = 60 - 70 \text{ }^{\circ}\text{C}$
 $T_{\text{base}} = 80 - 90 \text{ }^{\circ}\text{C}$

2ª zona: $T = 100 - 110 \text{ }^{\circ}\text{C}$

3ª zona: $T = 290 - 300 \text{ }^{\circ}\text{C}$

4ª zona: $T = 250 - 260 \text{ }^{\circ}\text{C}$

5ª zona: $T = 270 - 280 \text{ }^{\circ}\text{C}$

6ª zona: $T = 320 - 330 \text{ }^{\circ}\text{C}$

7ª zona: $T = 300 - 310 \text{ }^{\circ}\text{C}$

8ª zona: $T = 290 - 300 \text{ }^{\circ}\text{C}$

O tempo e a temperatura de cozimento são ajustados de forma a se reduzir a umidade do produto final a um valor entre 2 e 3%. Nos testes realizados, o tempo de cozimento dos biscoitos foi de 4,5 minutos.

Na saída do forno, os biscoitos em número de dez

foram pesados e a altura da pilha formada por eles, medida em cm, foi tomada como uma indicação da expansão durante o cozimento. Para controle da etapa de cozimento, a massa de 10 biscoitos "Maizena" cozidos deve estar entre 43 e 44 g e a sua espessura entre 5,0 e 5,1 cm.

6.7 - Resfriamento

Após o cozimento, os biscoitos foram resfriados em esteiras rolantes descobertas de aproximadamente 150 m e velocidade igual à velocidade da esteira metálica do forno (cerca de 20 m/s).

6.8 - Embalagem

Após o resfriamento, os biscoitos foram empecotados e selados no sistema de embalagem industrial. Nesta etapa, foram recolhidas amostras para a realização de testes físicos, físico-químicos e sensoriais.

7 - Caracterização dos Biscoitos Produzidos na Indústria

7.1 - Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em sistema de duplicata, de acordo com o item 5.1.

7.2 - Determinação da Umidade

A amostra de biscoito foi triturada em almofariz para reduzir a sua granulometria. A umidade foi determinada em duplicata, através de método gravimétrico (rápido) de determinação da umidade com lâmpada de aquecimento, utilizando-se uma balança automática determinadora de umidade (Ohaus, modelo 6010), segundo o manual do fabricante.

7.3 - Medidas Físicas

As medidas físicas foram efetuadas em seis conjuntos de 10 biscoitos, obtendo-se, dessa forma, seis valores para cada um dos seguintes parâmetros: massa dos biscoitos crus (g), massa dos biscoitos cozidos (g), espessura (cm), comprimento (cm), largura (cm), volume (cm^3) e densidade (g/cm^3) dos biscoitos cozidos. Esses parâmetros foram determinados conforme o item 5.3.

As perdas ponderais (%) no cozimento foram calculadas considerando-se a variação percentual da massa média dos biscoitos cozidos em relação à massa média dos biscoitos crus.

Com exceção de perdas ponderais no cozimento, os demais parâmetros foram avaliados de acordo com a análise estatística descrita no item 8.4.

7.4 - Análise Sensorial

Foram realizados ensaios sensoriais dos biscoitos, utilizando-se a escala não-estruturada para avaliar os parâmetros aroma, sabor, crocância e preferência, envolvendo os três

tratamentos realizados na indústria. Foi usada luz vermelha para mascaramento da cor dos biscoitos. A equipe foi composta por treze provadores instruídos com relação aos parâmetros avaliados e ao tipo de ficha utilizada, com escala de 1 a 10 pontos. O modelo da ficha é apresentado na figura 3. A análise estatística foi realizada de acordo com o item 8.4, considerando-se a média dos provadores e um comportamento estável da equipe nas seções de prova.

BISCOITO

NOME: _____

DATA: _____

Prove as amostras da esquerda para a direita e avalie, nas escalas abaixo, os parâmetros aroma, sabor, crocância e preferência.

Nº amostras

AROMA

Ruim

Excelente

Nº amostras

SABOR

Ruim

Excelente

Nº amostras

CROCANCIA

Ruim

Excelente

Nº amostras

PREFERÊNCIA

Desgostei
Muitíssimo

Gostei
Muitíssimo

Comentários: _____

Figura 3 - Modelo da ficha utilizada na análise sensorial dos biscoitos.

8 - Análise Estatística

8.1 - Estimativa dos Desvios-Padrão dos Métodos de Determinação da Consistência Final, Resistência à Extensão, Resistência Máxima e Extensibilidade

A fim de se avaliar a variabilidade do método de determinação da consistência final, foi feita a comparação entre as variâncias de 4 blocos de medidas independentes. Cada bloco era formado por no mínimo 3 medidas, totalizando 18 medidas de consistência. Da mesma forma, para a resistência à extensão e a resistência máxima foram analisados 31 blocos de medidas independentes. Cada bloco era constituído por no mínimo 3 medidas, tanto para a resistência à extensão quanto para a resistência máxima. No total, foram analisadas 125 medidas de cada um desses dois parâmetros. Finalmente, foram analisados 8 blocos de medidas independentes da extensibilidade. Cada bloco era formado por no mínimo 3 medidas, perfazendo um total de 30 medidas. Supondo-se que as medidas se distribuíam normalmente, aplicou-se o teste de Bartlett para cada um desses parâmetros. Esse teste foi escolhido devido ao tamanho variável dos blocos. Ao se verificar que as variâncias dos blocos de cada parâmetro não diferiram entre si ao nível de 1% de significância, calculou-se um estimador ("pooled") da variância para cada um desses parâmetros (GREEN & MARGERISON, 1978).

8.2 - Verificação da Possibilidade de Associação entre os Parâmetros Reológicos e a Concentração de Protease

Foi realizado o teste "t" de Student para as correlações entre os parâmetros reológicos (transformados quando necessário) e a concentração de protease utilizada para o teste de hipótese $H_0: \rho = 0$ X $H_1: \rho \neq 0$, com nível de significância de 1%. Os coeficientes de correlação denotados por (*) foram significativos (NEGRILLO & GONÇALVES, 1985).

8.3 - Estimativa do Desvio-Padrão do Método de Determinação do Volume dos Biscoitos

Para avaliar a variabilidade do método de determinação do volume, procedeu-se à comparação entre as variâncias de 16 blocos de medidas independentes, onde cada bloco se referia a um conjunto determinado de 10 biscoitos, perfazendo um total de 78 medidas de volume. Supondo-se que as medidas se distribuíam normalmente aplicou-se o teste de Bartlett, que foi escolhido devido ao tamanho variável dos blocos. Uma vez que não se verificou desigualdade das variâncias ao nível de 1% de significância, utilizou-se um único estimador ("pooled") para determinar o desvio-padrão do método (GREEN & MARGERISON, 1978).

8.4 - Avaliação Estatística das Medidas Físicas e da Análise Sensorial dos Biscoitos Industriais

Para avaliar os resultados obtidos, testou-se a hipótese das médias dos parâmetros analisados serem iguais.

Supondo-se que a variância foi a mesma para todos os tratamentos e que as medidas se distribuíam normalmente, aplicou-se a análise de variância a um critério ("one-way ANOVA") para o caso de ensaios inteiramente aleatorizados. Quando o teste acusou diferença significativa entre as médias, utilizou-se o teste de Tukey para a identificação dessas diferenças (GREEN & MARGERISON, 1978).

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 - Caracterização das Farinhas de Trigo

As farinhas de trigo usadas no preparo das massas de biscoito no laboratório (farinha I) e na indústria (farinha II) foram caracterizadas através de testes químicos, físico-químicos e reológicos.

1.1 - Composição Centesimal

A composição centesimal das farinhas de trigo é apresentada na tabela I. As determinações foram realizadas em triplicata. Os teores de proteínas e cinzas estão dentro das faixas encontradas na literatura para farinhas de trigo (Ranum et alii, 1980).

1.2 - Testes Físico-Químicos

As determinações do pH e do conteúdo de glúten foram feitas em duplicata.

a) pH da farinha I = 6,10

pH da farinha II = 6,15

Os valores de pH das farinhas I e II estão dentro da faixa encontrada na literatura (5,8 a 6,4) para farinhas de trigo não-tratadas quimicamente (PYLER, 1973).

TABELA I

Composição Química das Farinhas de Trigo

COMPONENTES	FARINHA I C%	FARINHA II C%
Proteínas (N x 5,7)	11,93	11,17
Lipídios	2,08	2,08
Cinzas	0,78	0,72
Umidade	11,70	10,87
Carboidratos ¹	73,53	75,16

¹Os carboidratos foram determinados por diferença.

b) Conteúdo de glúten:

FARINHA I	FARINHA II
glúten úmido = 31,9%	glúten úmido = 30,8%
glúten seco = 10,4%	glúten seco = 10,6%

Os valores de glúten seco das farinhas I e II foram ligeiramente inferiores aos do intervalo citado na literatura (11 a 13,9%) para várias farinhas de trigo analisadas (PYLER, 1973).

1.3 - Testes Reológicos

a) Características farinográficas

Os resultados dos farinogramas das farinhas analisadas estão apresentados na tabela II. Os valores da absorção de água, do tempo de desenvolvimento e da estabilidade foram, respectivamente, 64,5%, 6,5 minutos e 9,5 minutos para a farinha I e 59,5%, 6,5 minutos e 14,0 minutos para a farinha II. As faixas desses mesmos parâmetros estabelecidas por PRATT (1978) para farinhas adequadas à produção de biscoitos são 48-52%, 1-3 minutos e 1-2 minutos, respectivamente. Nota-se que as farinhas usadas apresentaram, para esses parâmetros, valores superiores àqueles recomendados na literatura. Concluiu-se que, embora nenhuma das farinhas usadas apresentasse características de mistura adequadas à produção de biscoito, as características da farinha I foram mais próximas das faixas recomendadas. Esses resultados mostram a necessidade do uso de aditivos para o condicionamento das massas de biscoito produzidas a partir dessas farinhas.

TABELA II

Características Farinográficas das Farinhas de Trigo

PARAMETROS	FARINHA I	FARINHA II
Absorção de água (%)	64,5	59,5
Tempo de chegada (min)	1,5	1,0
Tempo de desenvolvimento (min)	6,5	6,5
Estabilidade (min)	9,5	14,0
Índice de tolerância (UF)	60	20

b) Características extensográficas

Os resultados dos extensogramas das farinhas analisadas estão apresentados na tabela III. Observa-se que os valores da resistência à extensão da farinha II foram superiores aos da farinha I, em todos os tempos do teste. Além disso, os valores da extensibilidade da farinha II foram sempre inferiores aos da farinha I. Esses resultados extensográficos também indicam que a farinha I apresenta características mais adequadas à produção de biscoitos, em relação à farinha II. Com efeito, as farinhas para biscoitos devem apresentar uma estrutura de glúten menos elástica e mais extensível, para evitar ou minimizar a retração da massa na laminação (EL DASH et alii, 1982).

TABELA III

Características Extensográficas das Farinhas de Trigo

PARAMETROS	TEMPO DO TESTE (min)		
	45	90	135
	FARINHAS	FARINHAS	FARINHAS
	I - II	I - II	I - II
Resistência à extensão (RE)	200-280	210-300	170-280
(UE)			
Resistência máxima (RM)	330-450	350-470	310-430
(UE)			
Extensibilidade (E)	250-190	260-170	240-174
(mm)			
Número Proporcional (D)	0,8-1,5	0,8-1,8	0,7-1,6
(D = RE/E)			
Energia (A)	114-115	120-104	91-100
(cm ²)			

2 - Escolha dos Parâmetros Reológicos para a Determinação da Proteólise nas Massas de Biscoito Semidoce Duro

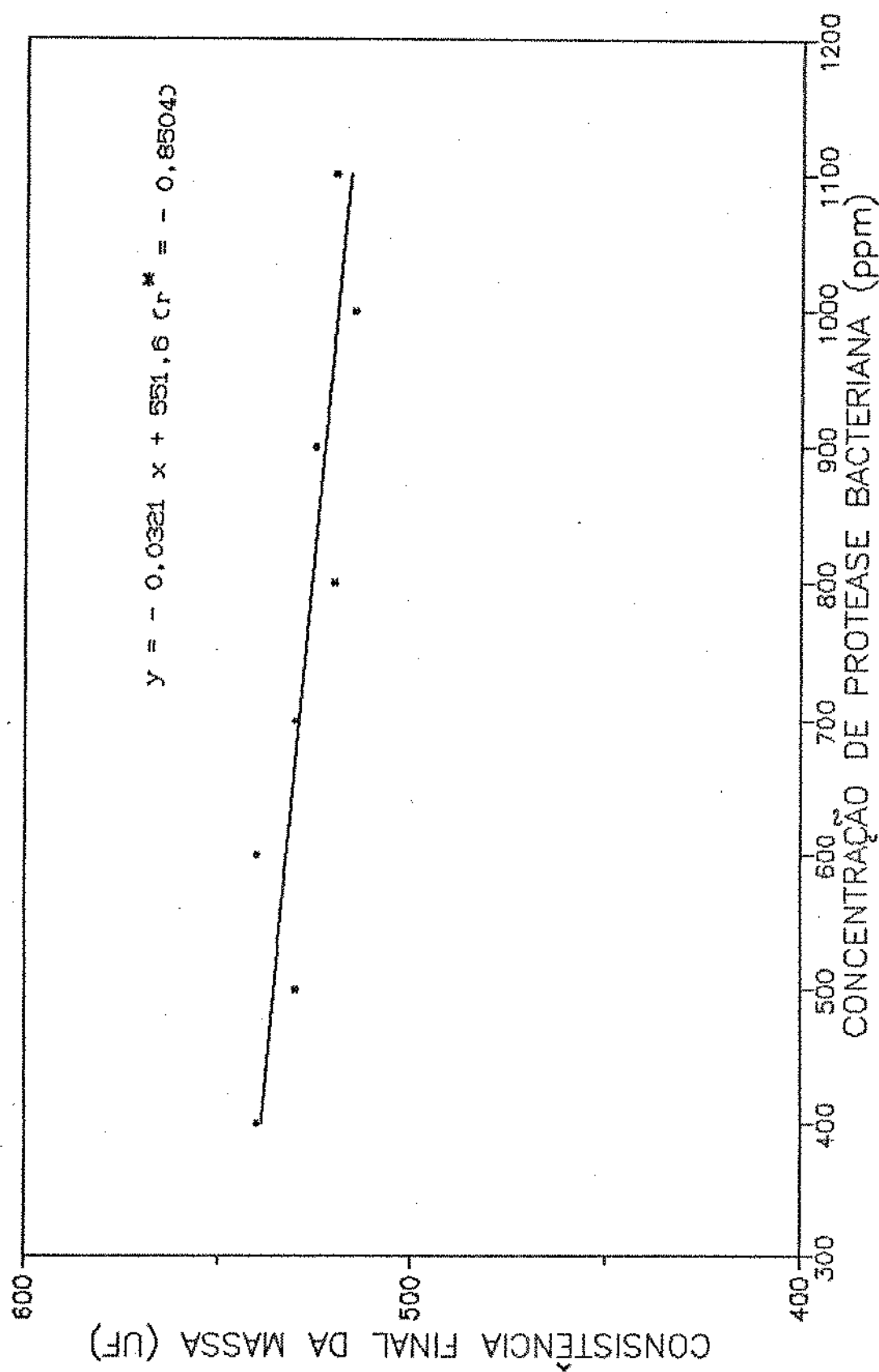
A escolha dos parâmetros reológicos mais adequados ao estudo da proteólise nas massas foi feita entre a consistência final da massa, determinada no farinógrafo, e a extensibilidade, resistência à extensão e resistência máxima, determinadas no extensógrafo, conforme descrito no item 4.1.

2.1 - Uso do Parâmetro Farinográfico: Consistência Final

As consistências finais da massa-padrão (com bissulfito de sódio) e da massa sem aditivo foram determinadas no farinógrafo, encontrando-se os valores médios de 520 e 540 UF, respectivamente. Comparando-se esses valores, observou-se que a adição de bissulfito provocou apenas uma pequena diminuição na consistência final da massa.

O efeito da adição de níveis crescentes de protease bacteriana (400 a 1100 ppm) na consistência final das massas está representado no gráfico 1. Observou-se também que a consistência final das massas variou muito pouco e que a reta representativa desses pontos apresentou uma leve inclinação, indicando uma pequena queda de consistência com o aumento da concentração de protease. Esses resultados mostraram que, nas condições analisadas, as doses de protease bacteriana usadas não foram suficientes para provocar modificações sensíveis na consistência final das massas. Resultados similares foram encontrados por PETIT & AUDIDIER (1967) ao observarem que somente em altas concentrações de protease foram registradas modificações perceptíveis na

Gráfico 1 - Efeito da adição de protease bacteriana na consistência final das massas. A curva é do tipo: $y = ax + b$.



consistência.

Comparando-se a consistência final da massa (520 UF) na concentração mais alta de protease estudada com a consistência final da massa sem aditivo (540 UF), observou-se que a diferença entre esses valores foi de apenas 20 UF. Considerando-se que a diminuição da consistência final da massa foi muito pequena e que o desvio-padrão estimado para o método foi de 14 UF, concluiu-se que esse parâmetro farinográfico não constituiu um bom indicador da proteólise na massa, nas condições analisadas. Resultados semelhantes foram também observados por BERGER *et alii* (1974) que tentaram usar a consistência máxima da massa, registrada no farinógrafo, como indicador da proteólise.

2.2 - Uso dos Parâmetros Extensográficos: Extensibilidade, Resistência à Extensão e Resistência Máxima

2.2.1 - Medidas da Extensibilidade das Massas

As características extensográficas da massa sem aditivo foram determinadas no extensógrafo, encontrando-se o valor médio de 125 mm para a extensibilidade. Com a adição de bissulfito de sódio no preparo da massa-padrão, a extensibilidade foi sensivelmente aumentada, sendo superior a 280 mm, que é o valor máximo registrado pelo aparelho.

Na tabela IV estão apresentados os valores médios obtidos para a extensibilidade das massas em função de níveis crescentes de adição de protease. O desvio-padrão estimado para esse método foi de 18 mm. Observou-se que a extensibilidade aumentou com o aumento da concentração de protease na faixa de 400

TABELA IV

Extensibilidade das Massas com Protease Bacteriana

Concentração de Protease (ppm)	Extensibilidade Média (mm)
400	192
500	221
600	244
700	>280
800	>280
900	>280
1000	>280
1100	>280

a 700 ppm. Para as concentrações estudadas acima de 600 ppm, foram obtidas extensibilidades superiores ao valor máximo de 280 mm registrado pelo aparelho. Portanto, não foi possível determinar valores da extensibilidade, tanto para a massa-padrão quanto para as massas com concentrações de protease superiores a 600 ppm. Conseqüentemente, não foi possível fixar um valor de concentração de protease no qual a extensibilidade fosse a mesma da massa com bissulfito.

Concluiu-se, portanto, que o parâmetro extensibilidade foi mais sensível à proteólise, nas condições analisadas, quando comparado à consistência final. No entanto, o uso desse parâmetro para indicar o grau de proteólise na massa foi limitado pelas próprias características do aparelho, que não registra extensibilidades superiores a 280 mm.

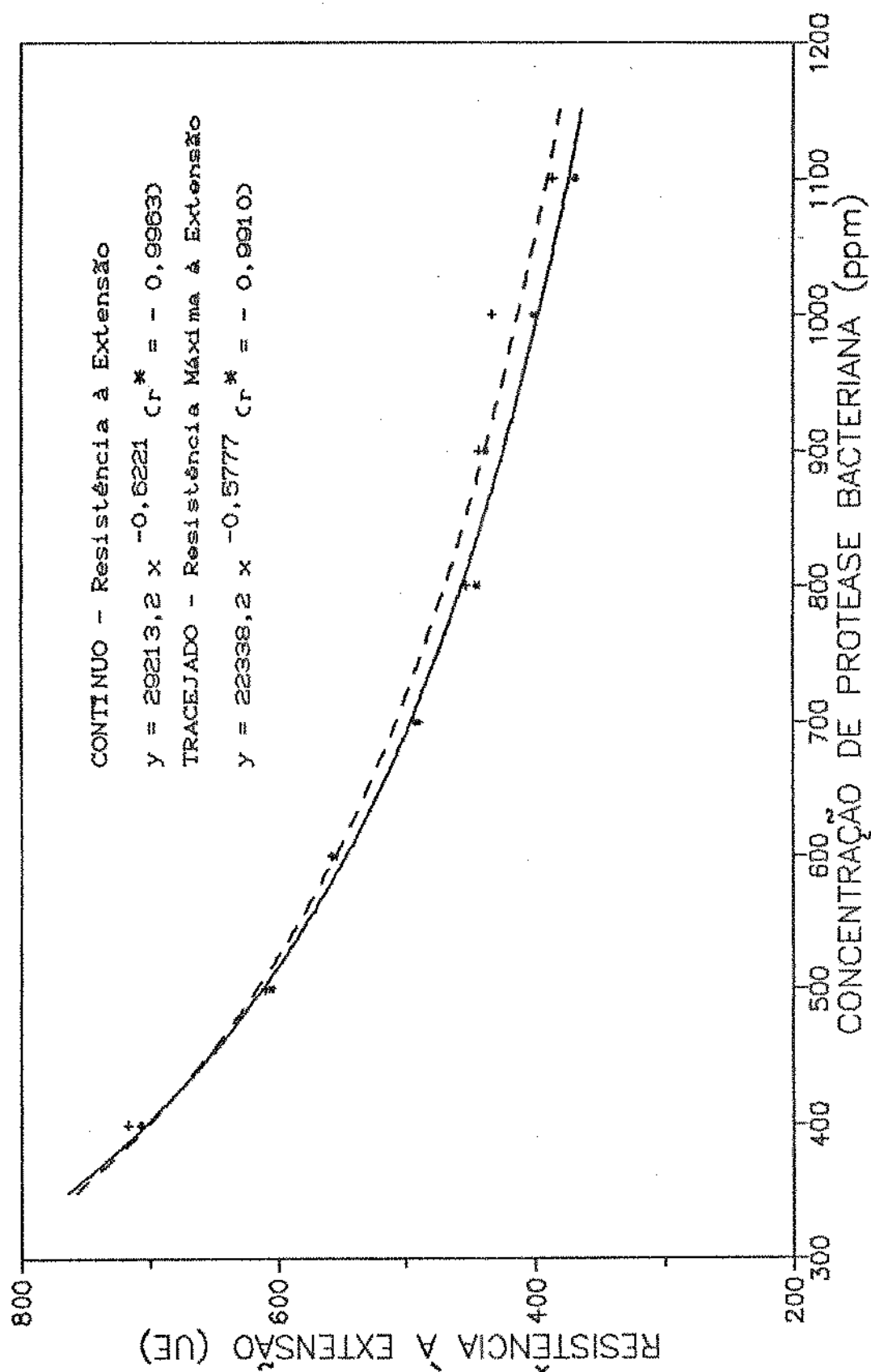
2.2.2 - Medidas da Resistência à Extensão e Resistência Máxima das Massas

Os parâmetros resistência à extensão e resistência máxima para a massa-padrão foram determinados no extensógrafo, encontrando-se os valores médios de 400 e 440 UE, respectivamente. Entretanto, para a massa sem aditivo não foi possível medir esses parâmetros, pois ambos foram superiores ao valor máximo de 1000 UE, registrado pelo aparelho. Notou-se, claramente, que a adição de bissulfito de sódio à massa provocou uma forte redução de sua resistência à extensão (elasticidade), em relação à massa sem aditivo. Esse efeito foi benéfico, conferindo à massa características viscoelásticas adequadas à produção de biscoitos.

O efeito da adição de níveis crescentes de protease

bacteriana (400 a 1100 ppm) na resistência à extensão (RE) e na resistência máxima (RM) das massas está representado no gráfico 2. Observou-se que o comportamento desses dois parâmetros foi similar e que tanto RE quanto RM diminuíram sensivelmente com o aumento da concentração de protease na massa. Observou-se também que as taxas de decréscimo de RE e RM com o aumento da concentração da enzima foram maiores nas concentrações mais baixas de protease. Os coeficientes de correlação calculados foram $r = -0,9963$ para RE e $r = -0,9910$ para RM, o que mostra um excelente ajuste da curva $y = a x^b$ aos dados experimentais. Com as equações das curvas apresentadas, foram calculados os valores de RE e RM para as concentrações extremas de protease estudadas (400 e 1100 ppm). A diferença encontrada entre os valores extremos foi de 328 e de 310 UE para RE e RM, respectivamente. Além disso, o desvio-padrão estimado foi de 25 UE para RE e de 26 UE para RM. Portanto, pôde-se constatar que esses dois parâmetros foram bem mais sensíveis a variações na concentração de protease quando comparados à consistência final, tendo sido, portanto, escolhidos como indicadores da intensidade de proteólise na massa. Resultados similares foram observados por MENDER & BRETSCHNEIDER (1971), ao estudarem a ação de proteases de diferentes origens (fúngica, bacteriana e vegetal) em massas de biscoito. Eles observaram que os parâmetros extensográficos, resistência à extensão e extensibilidade, foram mais sensíveis à proteólise quando comparados à consistência de mistura registrada no misturador-desenvolvedor do Do-Corder.

Gráfico 2 - Efeito da adição de protease bacteriana na resistência à extensão (RE) e resistência máxima (RMD) das massas. As curvas são do tipo $y = ax^b$.



Os valores de RE (400 ± 25 UE) e de RM (440 ± 26 UE) da massa-padrão foram adotados como referência para se determinar a faixa ideal de concentração de protease a ser usada na produção dos biscoitos. Para isso foram usadas as equações das curvas que relacionam RE e RM com a concentração de enzima (gráfico 2), obtendo-se concentrações de protease nas faixas de 898 a 1098 ppm para RE e de 811 a 996 ppm para RM.

Portanto, os parâmetros RE e RM das massas permitiram estabelecer uma faixa de concentração de protease de 900 a 1000 ppm para uso no preparo das massas de biscoito. Nessa faixa, ambos os parâmetros da massa-padrão com bissulfito são reproduzidos.

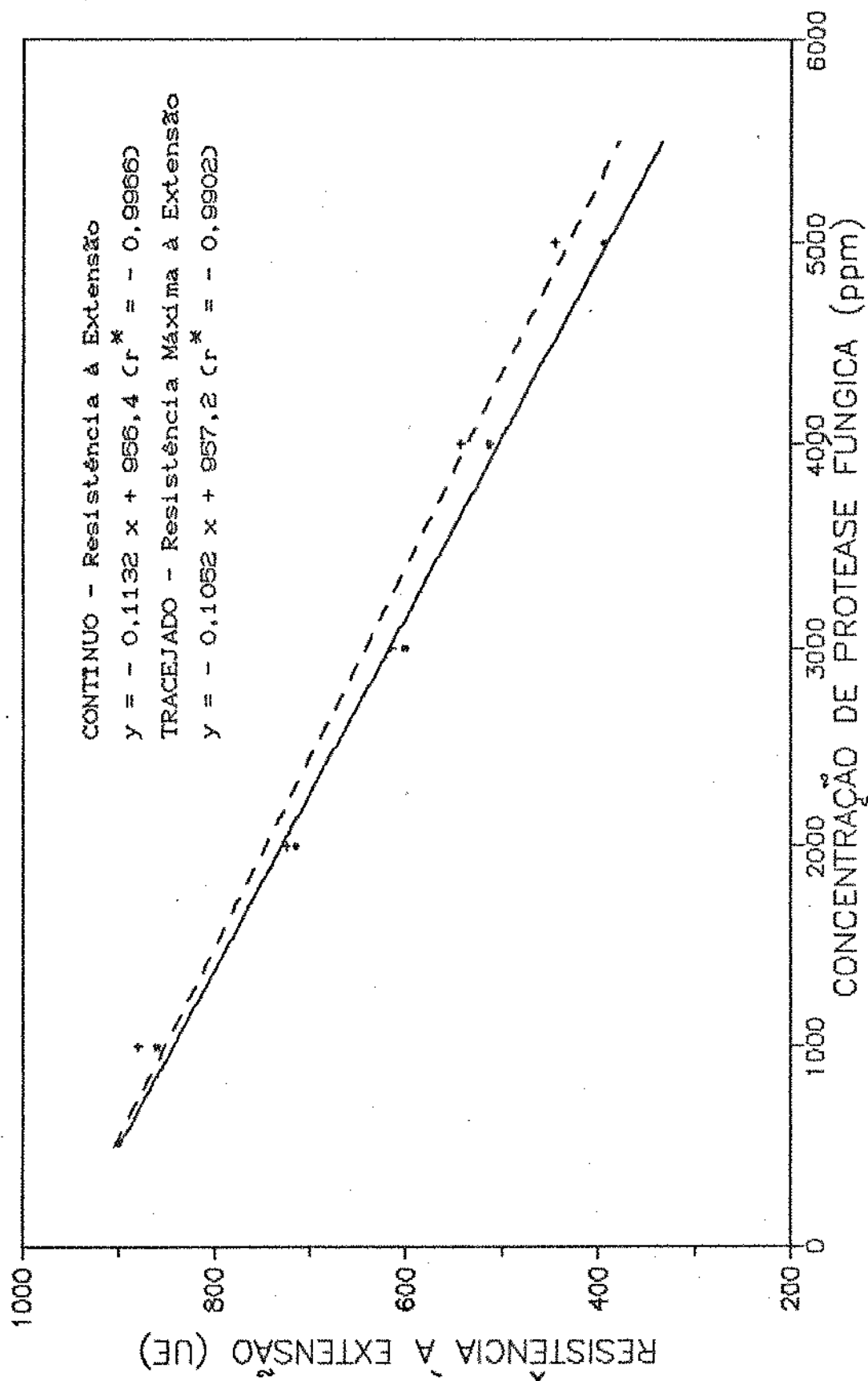
3 - Efeito da Adição de Proteases de Origem Fúngica e Bacteriana nas Massas

A fim de se escolher a enzima mais adequada à produção dos biscoitos semidoces duros, foram realizados testes no extensógrafo com as proteases de origem fúngica e bacteriana, à temperatura de 33°C .

No gráfico 3 está representada a variação da resistência à extensão (RE) e resistência máxima (RM) das massas com a concentração de protease de origem fúngica. As retas representativas dos pontos mostraram uma queda nos valores de RE e RM com o aumento da concentração da protease.

Através das equações das retas, encontrou-se que os valores de RE e RM da massa-padrão (400 ± 25 UE e 440 ± 26 UE, respectivamente) são reproduzidos por concentrações de protease fúngica de 4694 a 5136 ppm para RE e de 4669 a 5163 ppm para RM.

Gráfico 3 - Efeito da adição de protease fúngica na resistência à extensão (RED) e resistência máxima (RM) das massas. As curvas são do tipo $y = ax + b$.



No intervalo de 4700 a 5150 ppm; tanto RE quanto RM reproduziram os valores obtidos com a massa-padrão. No entanto, usando-se a protease bacteriana, conforme estabelecido previamente no item 2.2.2, esse intervalo foi de 900 a 1000 ppm.

Concluiu-se que para alcançar o mesmo efeito causado pela adição de bissulfito de sódio na resistência à extensão e resistência máxima da massa é necessária uma concentração de protease fúngica cerca de 5 vezes superior à de protease bacteriana. Isso mostra uma maior eficácia da enzima bacteriana na degradação do glúten em relação à fúngica, o que está provavelmente relacionado com os mecanismos de ação dessas enzimas. De acordo com SPRÖBLER (1981), a liberação de grandes fragmentos de proteína, causada pela ação das endopeptidases no interior das cadeias, provoca modificações mais intensas nas características reológicas da massa. Em contrapartida, as exopeptidases, ao agirem nos extremos das cadeias liberando aminoácidos, são menos efetivas na transformação dessas características. Acredita-se que a protease bacteriana usada apresente características de endopeptidase mais acentuadas do que a fúngica. Os resultados obtidos nesse estudo estão de acordo com SPRÖBLER (1981) e MONNIER & GODON (1975), que observaram que as proteases bacterianas apresentam uma ação mais agressiva sobre o glúten na massa, sendo, portanto, mais adequadas ao processamento de biscoitos do que as fúngicas. Por isso, todos os experimentos subsequentes, no laboratório e na indústria, foram realizados com a protease bacteriana.

4 - Efeito do Tempo de Descanso das Massas na Proteólise

Após ter sido estabelecida a faixa de concentração de protease bacteriana na massa sem descanso (900 a 1000 ppm), foi estudado o efeito na proteólise da introdução de um período de descanso de 30 minutos após a mistura da massa. A mistura e o descanso das massas foram realizados à temperatura de 33°C.

No gráfico 4 é apresentada a variação da resistência à extensão (RE) das massas com e sem descanso, em função da concentração de protease bacteriana. Como era esperado, os valores de RE das massas com descanso foram inferiores aos das massas sem descanso, quando comparados nos mesmos níveis de adição de protease na massa.

No gráfico 5 está representada a variação da resistência máxima (RM) das massas com e sem descanso, em função de doses crescentes de protease bacteriana. Para as concentrações de protease bacteriana até 500 ppm, foi observada uma diminuição dos valores de RM das massas com descanso em relação aos seus correspondentes para as massas sem descanso. Entretanto, para concentrações superiores a 500 ppm, os valores de RM para ambas as massas foram semelhantes, considerando-se o desvio-padrão de 26 UE calculado para o método.

Gráfico 4 - Efeito do tempo de descanso na resistência à extensão
 (RED) das massas. As curvas são do tipo $y = ax^b$.

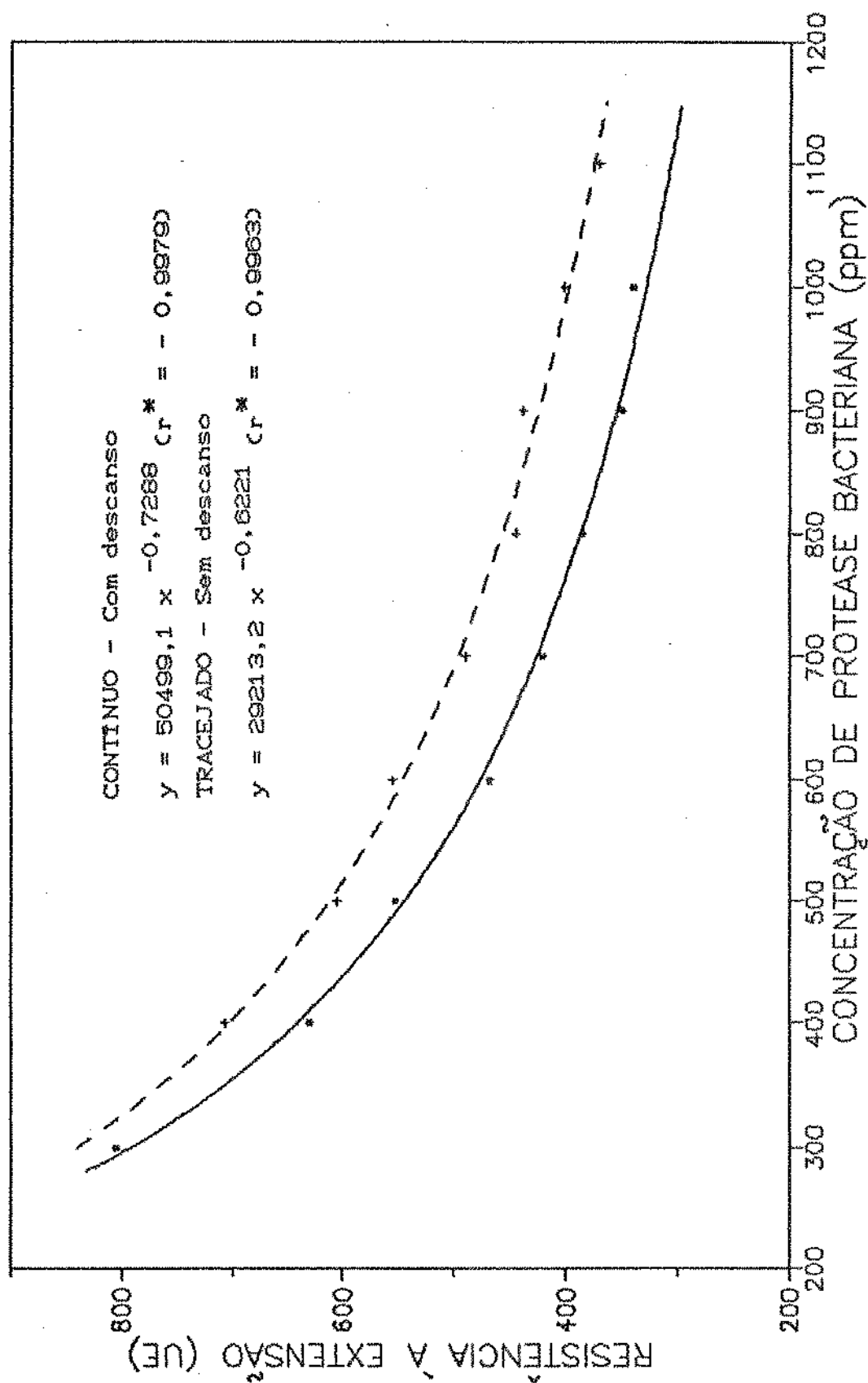
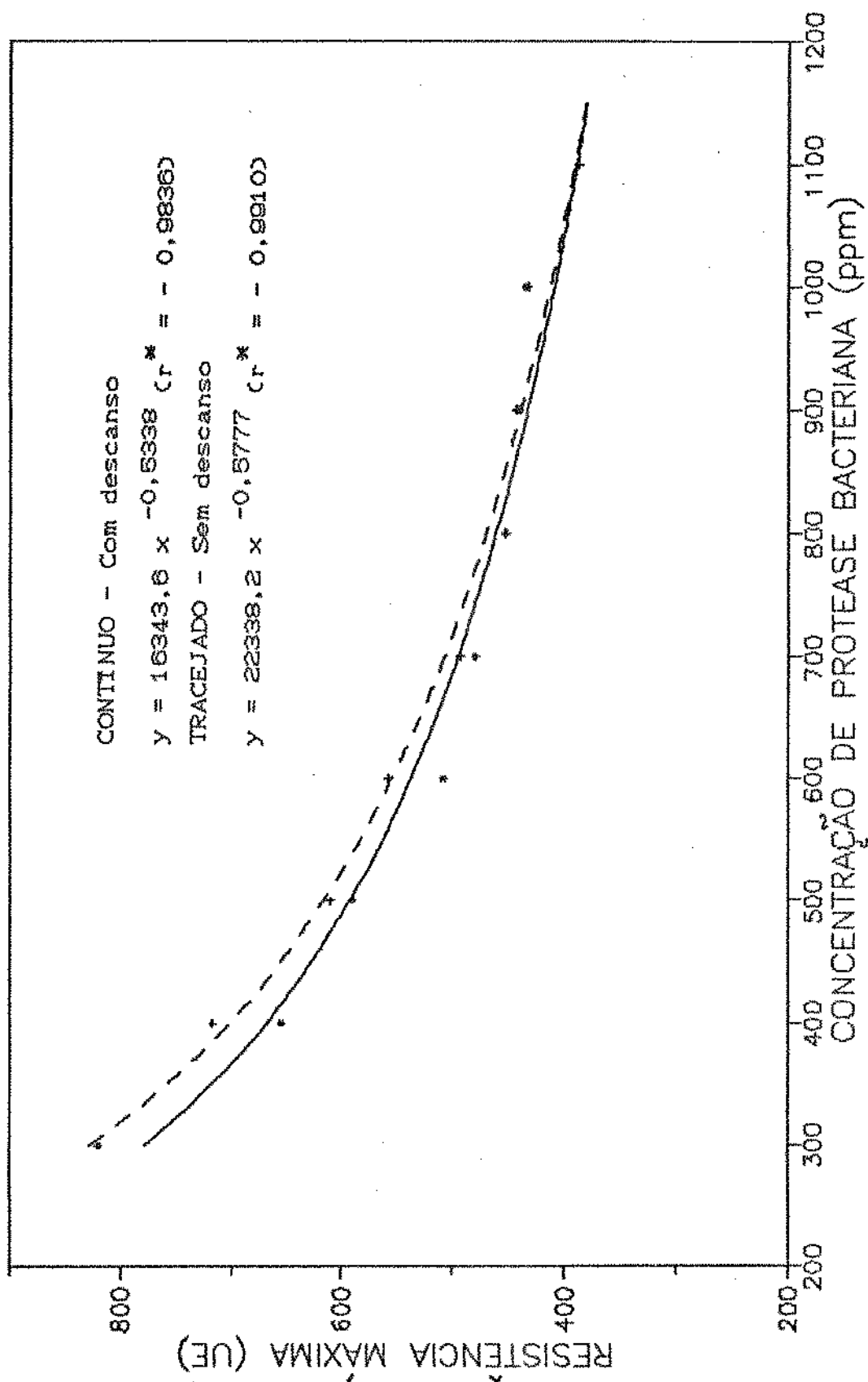
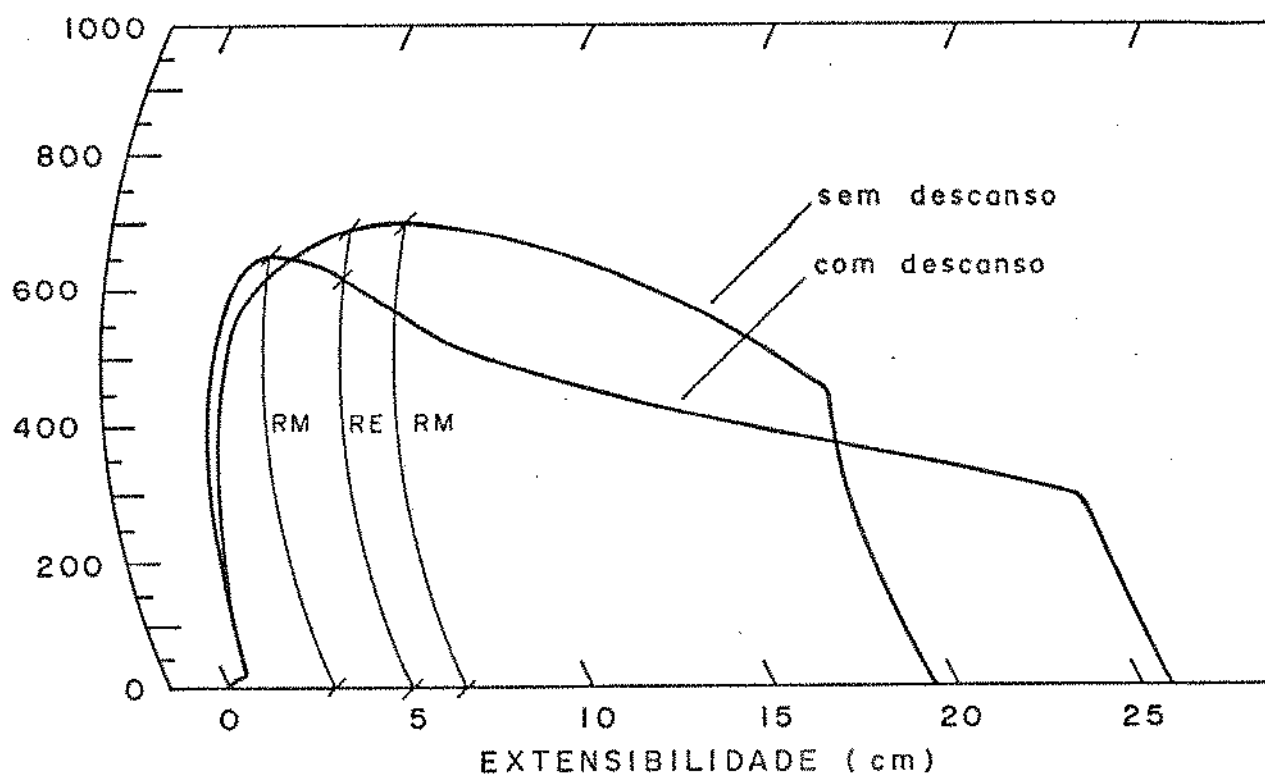


Gráfico 5 - Efeito do tempo de descanso na resistência máxima CRMD das massas. As curvas são do tipo $y = ax^b$.

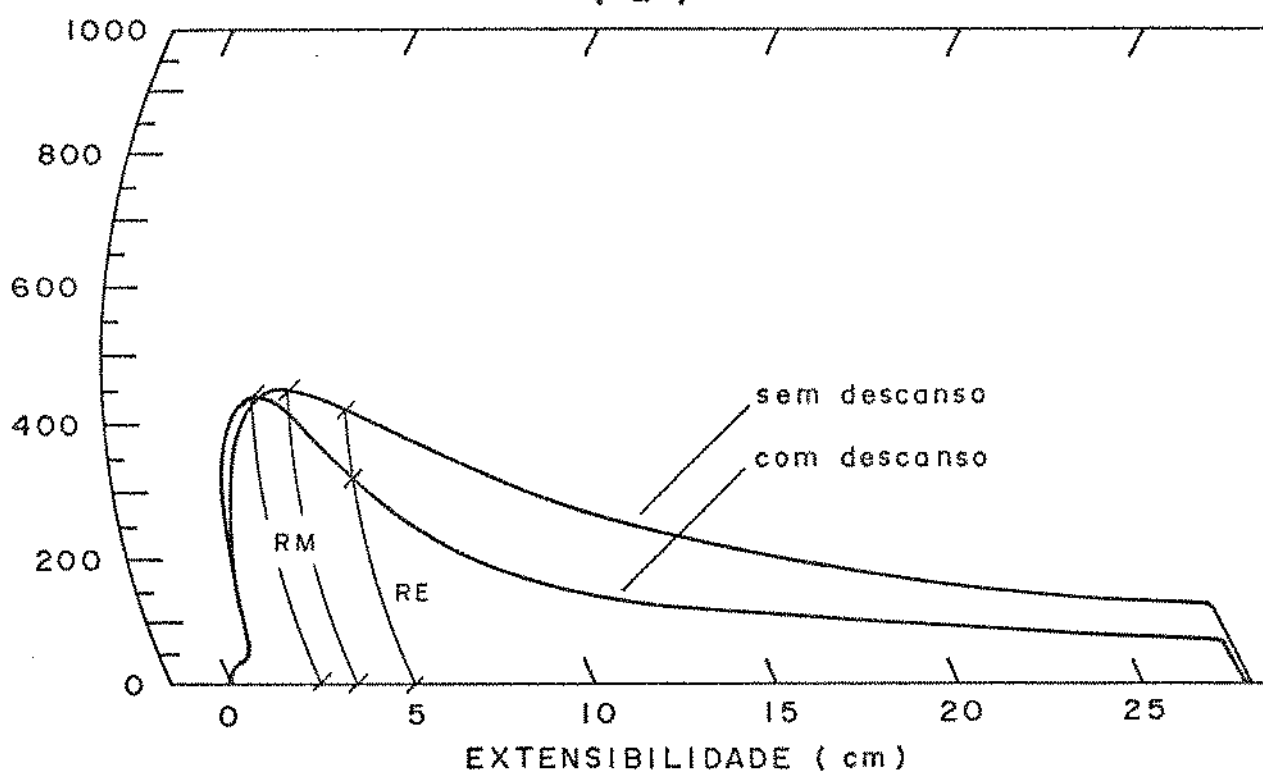


Na figura 4 são apresentados os extensogramas das massas com 400 ppm (fig. 4a) e 1000 ppm (fig. 4b) de protease bacteriana com e sem descanso. Para a concentração de protease de 400 ppm, pôde-se observar uma diminuição dos valores tanto de RE quanto de RM com o descanso da massa. Por outro lado, para 1000 ppm de concentração, somente RE diminuiu com o descanso.

Através das equações das curvas de RE e RM em função da concentração de protease para as massas com descanso (gráficos 4 e 5), encontrou-se que os valores de RE e RM da massa-padrão (400 ± 25 UE e 440 ± 26 UE, respectivamente) foram reproduzidos por concentrações de protease bacteriana de 703 a 835 ppm para RE e de 784 a 978 ppm para RM. No intervalo de concentração de 780 a 840 ppm, tanto RE quanto RM reproduziram os valores obtidos com a massa-padrão. Para as massas sem descanso, foi encontrado o intervalo de concentração de protease de 900 a 1000 ppm, obtendo-se, portanto, com o descanso de 30 minutos após a mistura, uma redução por volta de 15% na concentração da enzima. Resultados semelhantes foram apresentados por GUÉRIVIÈRE & BUSSIÈRE (1974) ao estudarem a relação existente entre a concentração de protease bacteriana (Bacillus subtilis) a ser usada em massas de biscoito e o período de descanso das mesmas após a mistura. Eles determinaram que para um descanso de 30 minutos foi necessário usar 1500 ppm de protease, ao passo que com 18 horas de descanso essa concentração foi reduzida para 300 ppm.



(a)



(b)

Figura 4 - Extensogramas de massas de biscoito com e sem descanso:

a - concentração de protease bacteriana = 400 ppm;

b - concentração de protease bacteriana = 1000 ppm.

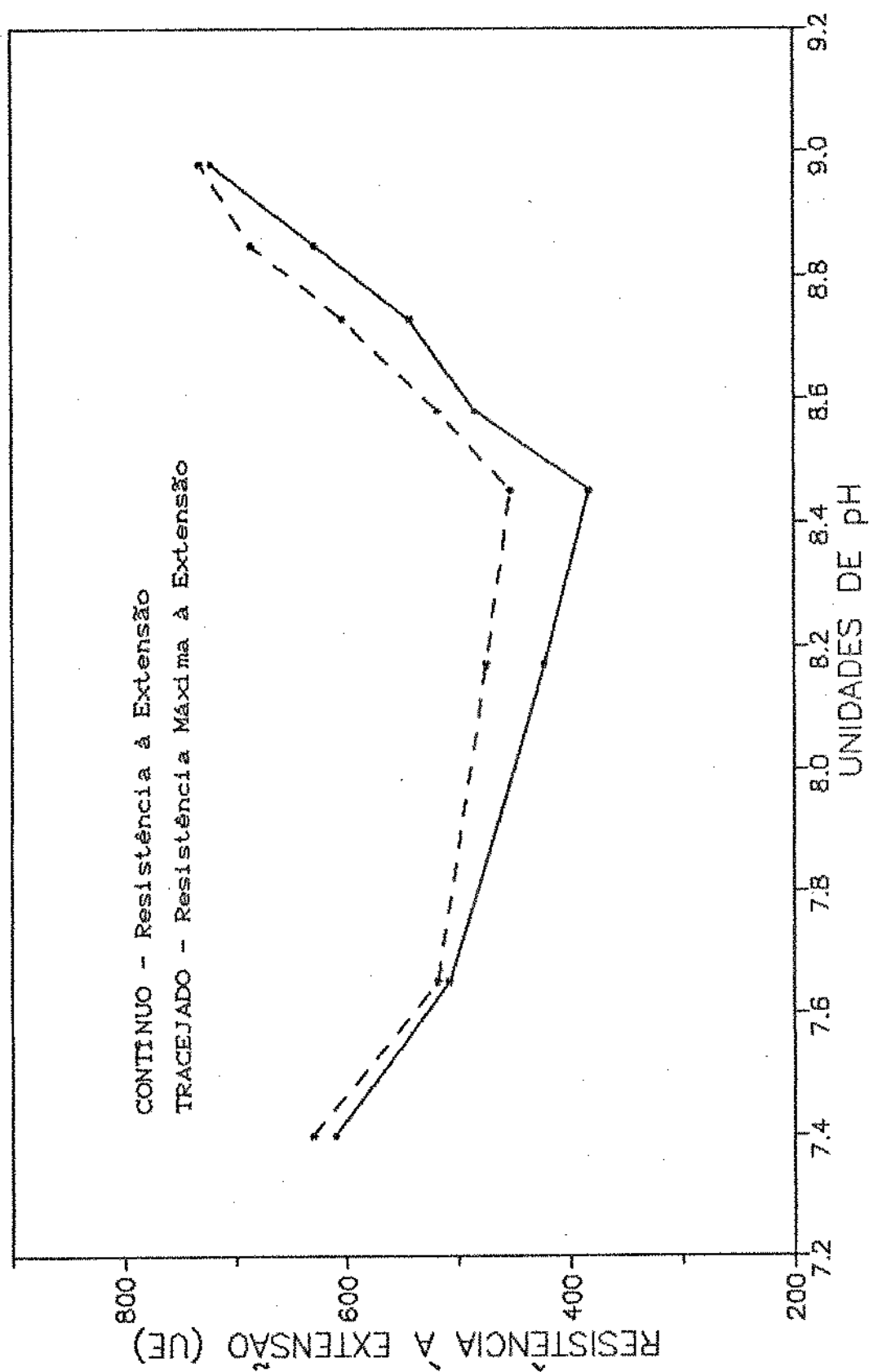
Concluiu-se que o aumento do tempo de ação da protease, além do período de mistura, contribuiu para aumentar o grau de proteólise na massa e reduzir a quantidade de enzima necessária. Portanto, a introdução do descanso pode constituir uma alternativa para se reduzirem os custos de utilização de proteases nas indústrias de biscoito.

6 - Efeito do pH das Massas na Proteólise

Para estudar a influência do pH da massa na proteólise, foi fixada a concentração de protease bacteriana em 800 ppm, que está dentro da faixa estabelecida (780 a 840 ppm) no item 4 para as massas com descanso. Nos experimentos realizados, os valores de pH foram determinados imediatamente após a mistura das massas, visto que os testes preliminares mostraram que não houve alteração do pH das mesmas após o período de descanso.

No gráfico 6 está representado o efeito do pH na resistência à extensão (RE) e resistência máxima (RM) das massas. Observou-se que no pH natural da massa ($8,45 \pm 0,05$) foram obtidos os menores valores de RE e RM. A adição de bicarbonato de sódio ou de ácido láctico na massa acarretou um aumento tanto de RE quanto de RM. Notou-se também que o aumento desses parâmetros foi mais acentuado para os valores de pH mais alcalinos. Ao se aumentar o pH de 8,45 para 9,00 (aproximadamente 0,5 unidades de pH), a variação de RE e RM ficou em torno de 300 UE. Em contrapartida, ao se diminuir o pH na mesma proporção, obteve-se uma variação inferior da ordem de 80 UE para esses dois parâmetros.

Gráfico 6 - Efeito do pH na resistência à extensão (RED e resistência máxima CRM) das massas.



A alteração dos valores de RE e RM com a adição de substâncias ácidas ou alcalinas nas massas foi provavelmente causada pela influência do pH na atividade da enzima e/ou no próprio substrato (glúten). De acordo com PYLER (1973), o efeito do pH na atividade das proteases é difícil de ser estudado isoladamente, devido à sua influência no próprio substrato. Isso provoca uma alteração nas faixas de pH ótimo de uma mesma protease, quando essa age sobre diferentes substratos. A faixa de pH ótimo determinada nesse estudo (8,40 a 8,50) não foi comparada com aquelas encontradas na literatura, pois essas últimas foram obtidas usando-se substratos diferentes do glúten, tais como hemoglobina e caseína.

Concluiu-se que a massa já apresenta um pH adequado à ação da protease bacteriana, não sendo necessária a sua modificação pela adição de ácido láctico ou bicarbonato de sódio.

6 - Efeito da Temperatura das Massas na Proteólise

Para estudar o efeito da temperatura na proteólise, foram realizados testes em que se aumentou a temperatura de mistura e descanso das massas de 33 para 38°C. Isso foi feito considerando-se que, no processo industrial de produção de biscoitos, são comumente registradas temperaturas da massa em torno de 40°C ao final do processo de mistura.

Nos gráficos 7 e 8 são mostradas as variações da resistência à extensão (RE) e da resistência máxima (RM) das massas com a concentração de protease bacteriana, nas temperaturas de mistura e descanso de 33 e 38°C, respectivamente. Observou-se uma diminuição dos valores de RE e RM a 38°C em relação aos seus

Gráfico 7 - Efeito da temperatura na resistência à extensão (RE) das massas. As curvas são do tipo $y = ax^b$.

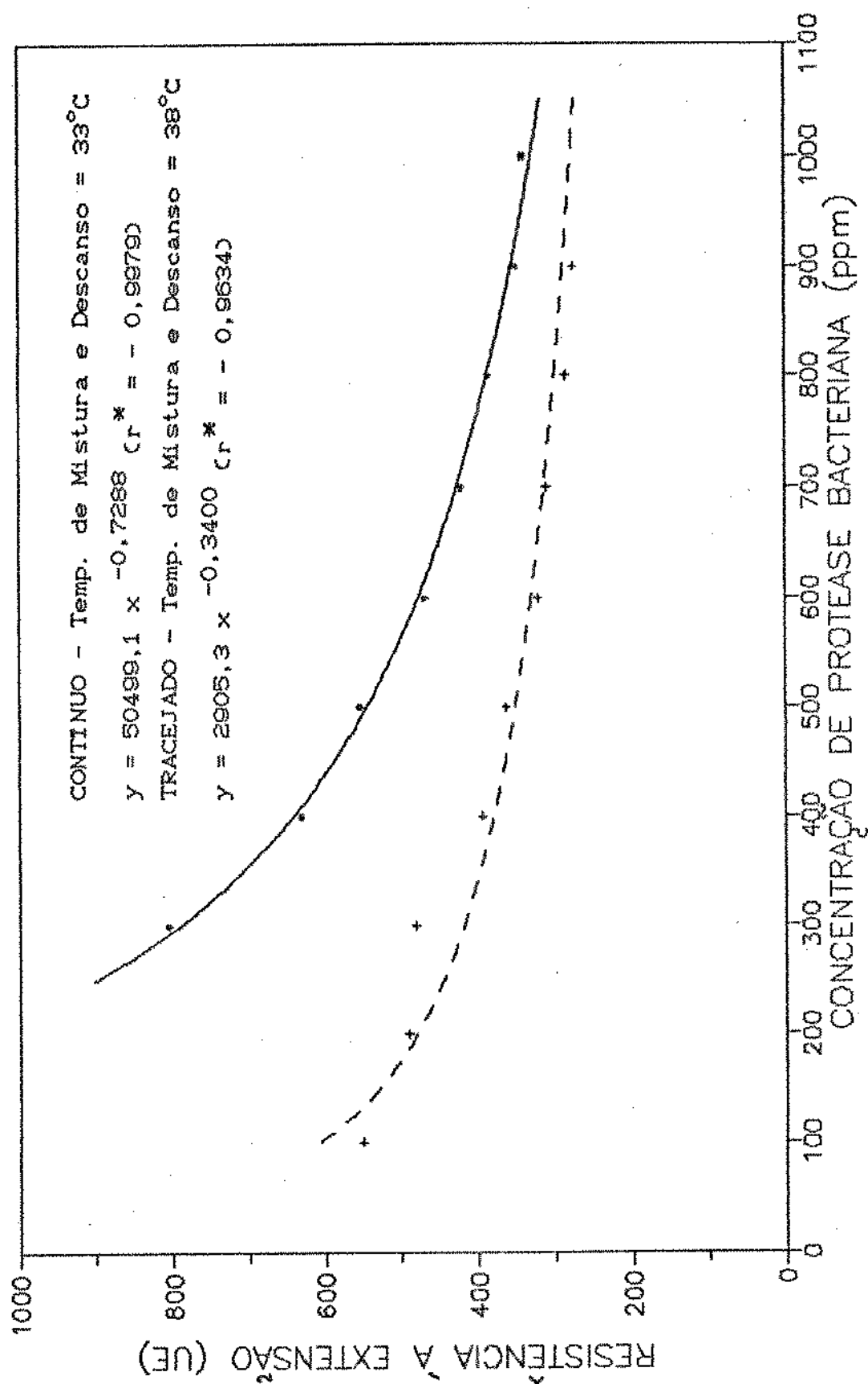
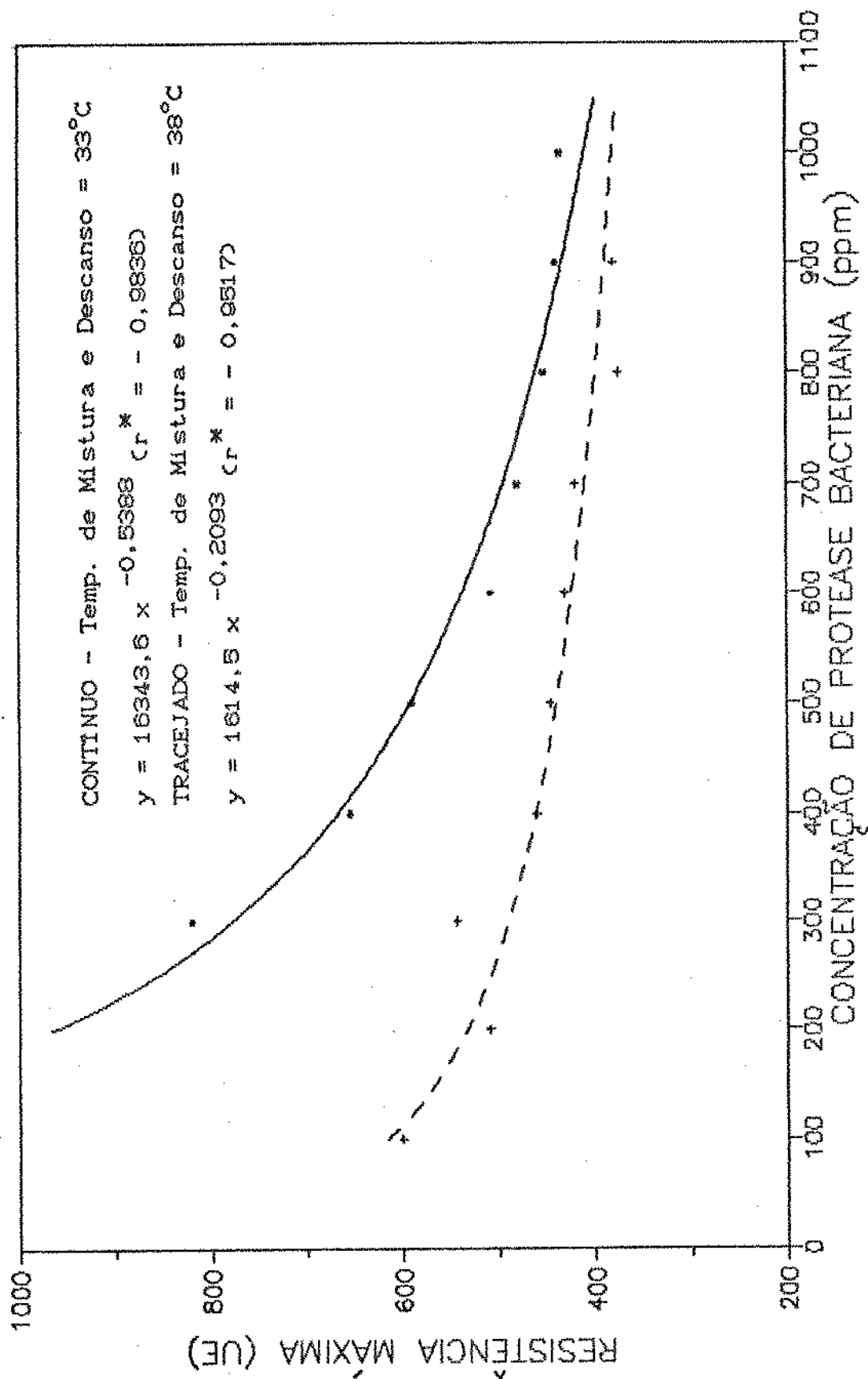


Gráfico 8 - Efeito da temperatura na resistência máxima CRM das massas. As curvas são do tipo $y = ax^b$.



correspondentes a 33°C. Além disso, uma característica comum a ambas as curvas é que tanto a redução de RE quanto a de RM com a temperatura foram bem mais acentuadas nas concentrações mais baixas de protease. Esses resultados mostraram claramente que o aumento da temperatura de mistura e descanso intensificou a proteólise na massa. De acordo com UHLIG & SPROBLER (1972), o controle da temperatura das massas com adição de protease é de grande importância, já que as enzimas degradam mais ligações por unidade de tempo com o aumento da temperatura.

Através das equações das curvas de RE e RM para as massas a 38°C (gráficos 7 e 8), encontrou-se que os valores de RE e RM da massa-padrão (400 ± 25 UE e 440 ± 26 UE, respectivamente) foram reproduzidos por concentrações de protease bacteriana de 285 a 412 ppm para RE e de 379 a 667 ppm para RM. No intervalo de 380 a 420 ppm, tanto RE quanto RM reproduziram os valores da massa-padrão. Para as massas com temperaturas de mistura e descanso de 33°C, encontrou-se uma faixa de concentração de 780 a 840 ppm, obtendo-se, portanto, uma redução de aproximadamente 50% na concentração de protease, com o aumento de apenas 5°C na temperatura de mistura e descanso das massas.

7 - Processamento dos Biscoitos Semidoces Duros em Laboratório

Com o estudo da proteólise na massa foram determinadas as faixas de concentração de protease bacteriana que melhor reproduziram os efeitos da adição de bissulfito de sódio na massa. A partir desses resultados, foram produzidos biscoitos em laboratório, segundo os tratamentos que seguem:

Tratamento 1 (padrão) - massa com 1000 ppm de bissulfito de sódio, temperatura de mistura de 33°C e sem descanso.

Tratamento 2 - massa com 1000 ppm de protease bacteriana, temperatura de mistura de 33°C e sem descanso.

Tratamento 3 - massa com 850 ppm de protease bacteriana, temperatura de mistura de 33°C e descanso de 30 minutos, na mesma temperatura.

Tratamento 4 - massa com 400 ppm de protease bacteriana, temperatura de mistura de 33°C e descanso de 30 minutos, na mesma temperatura.

O tratamento 1 foi usado como referência para comparação com os demais tratamentos realizados com adição de protease bacteriana.

Observou-se que, nas mesmas condições de processamento (tratamentos 1 e 2), utilizou-se igual quantidade dos aditivos bissulfito de sódio e protease bacteriana.

Na tabela V são apresentadas as características das massas usadas na produção dos biscoitos em laboratório.

TABELA V

Características das Massas para a Produção dos
Biscoitos em Laboratório

Tratamentos	Parâmetros extensográficos	Consistência final	pH
1	RE = 400 UE	530 UF	8,10
	RM = 430 UE		8,15
2	RE = 390 UE	520 UF	8,45
	RM = 440 UE		8,40
3	RE = 400 UE	520 UF	8,45
	RM = 460 UE		8,45
4	RE = 410 UE	420 UF	8,35
	RM = 430 UE		8,30

RE = resistência à extensão

UE = unidades extensográficas

RM = resistência máxima

UF = unidades farinográficas

Observou-se que as massas preparadas com protease bacteriana, segundo os tratamentos 2, 3 e 4, reproduziram as características extensográficas da massa-padrão ($RE = 400 \pm 25$ UE e $RM = 440 \pm 26$ UE). Além disso, as extensibilidades das massas em todos os tratamentos apresentados foram superiores a 280 mm. Por outro lado, as consistências finais das massas nos tratamentos 1, 2 e 3 foram superiores à do tratamento 4, pois este último foi realizado em uma temperatura mais alta de mistura. Por esse motivo, percebeu-se que a massa produzida pelo tratamento 4 apresentou uma menor resistência ao ser laminada do que as demais. Observou-se, também, que os valores de pH para os tratamentos 2 e 3 encontram-se dentro da faixa ótima de pH (8,40 a 8,50) previamente determinada para a protease bacteriana na massa, à temperatura de 33°C.

B - Caracterização dos Biscoitos Produzidos em Laboratório

Os biscoitos produzidos em laboratório foram caracterizados através das determinações de pH e umidade, das medidas físicas e da avaliação da qualidade.

8.1 - Umidade e pH

Os valores da umidade e do pH dos biscoitos estão apresentados na tabela VI.

TABELA VI

Umidade e pH dos Biscoitos Produzidos em Laboratório

Tratamentos	Umidade* (%)	pH*
1	6,2 ± 0,1	7,23 ± 0,03
2	6,8 ± 0,3	7,47 ± 0,06
3	5,5 ± 0,1	7,52 ± 0,03
4	5,4 ± 0,1	7,25 ± 0,05

*As medidas de umidade e pH foram feitas em triplicata

Os biscoitos produzidos em laboratório apresentaram umidade final na faixa de 5,4 a 6,2%. Em geral, os biscoitos produzidos na indústria apresentam umidade residual na faixa de 3 a 4% (VITTI, 1988). Os valores mais altos de umidade para os biscoitos produzidos em laboratório podem ser explicados pelas diferenças existentes entre as condições de cozimento na indústria e no laboratório. Normalmente, são usados na indústria fornos contínuos com aquecimento na base e no teto e divididos em zonas que possuem controle independente de temperatura. Por outro lado, o cozimento no laboratório foi feito em forno elétrico convencional, a uma temperatura constante.

Os valores de pH dos biscoitos produzidos em laboratório são bastante próximos e estão dentro da faixa encontrada na literatura (6,5 a 8,0) para biscoitos (PYLER, 1973).

8.2 - Medidas Físicas

Os resultados das medidas físicas efetuadas em 4 conjuntos de 10 biscoitos para cada tratamento estão apresentados nas tabelas VIIa e VIIb.

TABELA VIIa

Medidas Físicas dos Biscoitos Produzidos em Laboratório

Tratamentos	Massa dos bisc. crus (g)	Massa dos bisc. cozidos ² (g)	Perdas ponde- rais ³ (%)	Comprimento médio Lm (cm)
1	42,45	35,19	17,10	46,4
	44,82	37,10	17,22	46,7
	42,36	35,27	16,74	46,6
	44,53	36,80	17,36	46,9
2	42,20	34,73	17,70	47,0
	42,90	35,29	17,74	46,7
	44,14	36,10	18,21	47,4
	44,30	36,61	17,36	47,1
3	44,67	36,77	17,69	46,6
	44,17	36,30	17,82	47,3
	42,86	35,10	18,11	46,9
	43,85	35,97	17,97	47,1
4	43,57	35,64	18,20	46,1
	42,50	34,90	17,88	46,5
	42,42	34,93	17,66	46,5
	42,49	34,79	18,12	46,8

² Massa dos biscoitos cozidos e resfriados³ Perdas ponderais no cozimento e resfriamento

TABELA VIIb

Medidas Físicas dos Biscoitos Produzidos em Laboratório

Tratamentos	Regularidade de forma (L/l)	Espessura (cm)	Fator de expansão (Lm/E)	Volume ⁴ (cm ³)	Densidade (g/cm ³)
1	1,05	5,4	8,59	98,6	0,357
	1,04	5,6	8,34	103,4	0,359
	1,05	5,5	8,47	100,3	0,352
	1,04	5,4	8,69	100,1	0,368
2	1,05	5,2	9,04	99,3	0,350
	1,04	5,4	8,65	98,4	0,359
	1,03	5,2	9,12	99,3	0,364
	1,03	5,3	8,72	102,4	0,358
3	1,03	5,5	8,47	107,0	0,344
	1,04	5,3	8,92	98,2	0,370
	1,04	5,4	8,69	99,8	0,352
	1,04	5,4	8,72	102,6	0,351
4	1,04	5,5	8,38	103,4	0,345
	1,05	5,3	8,77	95,8	0,364
	1,04	5,5	8,45	95,8	0,365
	1,02	5,4	8,67	97,0	0,359

⁴O desvio-padrão para o método de determinação do volume dos biscoitos foi de 6,2 cm³.

Através de análise estatística, concluiu-se que os tratamentos 1, 2, 3 e 4 não diferiram entre si, ao nível de 1% de significância, em 8 dos 9 parâmetros determinados. A única exceção foi o parâmetro perdas ponderais no cozimento e resfriamento. Nesse caso, o tratamento 1 diferiu, ao nível de 1% de significância, dos tratamentos 3 e 4, porém não diferiu do tratamento 2. As médias obtidas para os quatro tratamentos foram: $X_1 = 17,11\%$, $X_2 = 17,75\%$, $X_3 = 17,90\%$ e $X_4 = 17,97\%$. A diferença nas perdas ponderais se refletiu na umidade final dos biscoitos, cujos valores médios para os quatro tratamentos foram: $U_1 = 6,2\%$, $U_2 = 5,8\%$, $U_3 = 5,5\%$, $U_4 = 5,4\%$. Tais resultados podem ser atribuídos às condições limitadas de cozimento no laboratório, com o uso de forno convencional. A temperatura de cozimento foi fixada em 250°C , porém foram observadas flutuações da ordem de 5°C em torno dessa temperatura. Essa variação de temperatura pode ter afetado a perda de água dos biscoitos no cozimento e, por consequência, a umidade residual dos mesmos, tendo em vista o tempo curto de cozimento de 4 minutos, fixado para todos os tratamentos.

Os biscoitos produzidos pelos 4 tratamentos apresentaram valores para o fator de expansão na faixa de 8,34 a 9,12. De acordo com TANILLI (1976), as farinhas médias para biscoitos apresentam fator de expansão na faixa de 7,5 a 9,0. Portanto, a adição de bissulfito ou de protease bacteriana possibilitou a produção de biscoitos com valores de fator de expansão dentro da faixa acima, a partir de uma farinha originalmente inadequada (farinha I).

De um modo geral, esses resultados mostraram que o uso de protease bacteriana possibilitou a produção de biscoitos

com características físicas similares àquelas obtidas com bissulfito de sódio. Concluiu-se, também, que a utilização dos parâmetros extensográficos RE e RM, a fim de se estabelecerem as concentrações de protease para substituir o bissulfito de sódio, foi bastante satisfatória.

8.3 - Avaliação da Qualidade

Foi realizada a avaliação da qualidade dos biscoitos produzidos em laboratório, cujos resultados estão apresentados na tabela VIII.

A avaliação da qualidade dos biscoitos, com respeito às características mencionadas na tabela, mostrou que os tratamentos 3 e 4 alcançaram a mesma pontuação total, que foi similar à do tratamento-padrão com bissulfito de sódio. Entretanto, o tratamento 2 apresentou a maior pontuação entre os tratamentos estudados, devido à maior nota atribuída à crocância. Com relação a esse parâmetro, observou-se que os biscoitos produzidos com bissulfito (tratamento 1) obtiveram nota inferior aos demais, por apresentarem uma textura mais rígida, exigindo um maior esforço na mastigação.

TABELA VIII

Avaliação da Qualidade dos Biscoitos Produzidos em Laboratório

Características	Nota máxima	Tratamentos			
		1	2	3	4
Cor	15	12	12	12	12
Forma	10	7	7	7	7
Sabor	30	30	30	30	30
Aroma	15	15	10	10	10
Crocância	30	21	30	27	27
Total	100	85	89	86	86

Como pode ser observado na figura 5, os 4 tratamentos forneceram biscoitos com coloração semelhante, apresentando apenas pequenas variações dentro de cada tratamento, provocadas provavelmente pela não-uniformidade na distribuição de calor dentro do forno, durante o cozimento.

Quanto à forma dos biscoitos, foram observadas pequenas deformações em todos os tratamentos, responsáveis pela diminuição da pontuação atribuída a essa característica. Essas irregularidades foram causadas por dificuldades associadas ao manuseio da massa nas operações de laminação e corte.

O sabor dos biscoitos foi semelhante nos quatro tratamentos, sendo considerado muito bom. Não se observou nenhuma alteração no sabor dos biscoitos nos tratamentos com protease. EL DASH & JOHNSON (1967) observaram que a adição de proteases em massas de pães também não alterou o sabor do produto final.

Os biscoitos com bissulfito (tratamento 1) apresentaram um aroma agradável e suave, característico desse tipo de biscoito. Por outro lado, nos tratamentos com protease (tratamentos 2, 3 e 4) observou-se uma intensificação do aroma de gordura no biscoito, responsável pela menor pontuação atribuída a essa característica. Entretanto, o aroma dos biscoitos com protease não foi considerado desagradável. EL DASH & JOHNSON (1967) observaram que a adição de proteases em massas de pães melhorou o aroma dos mesmos.

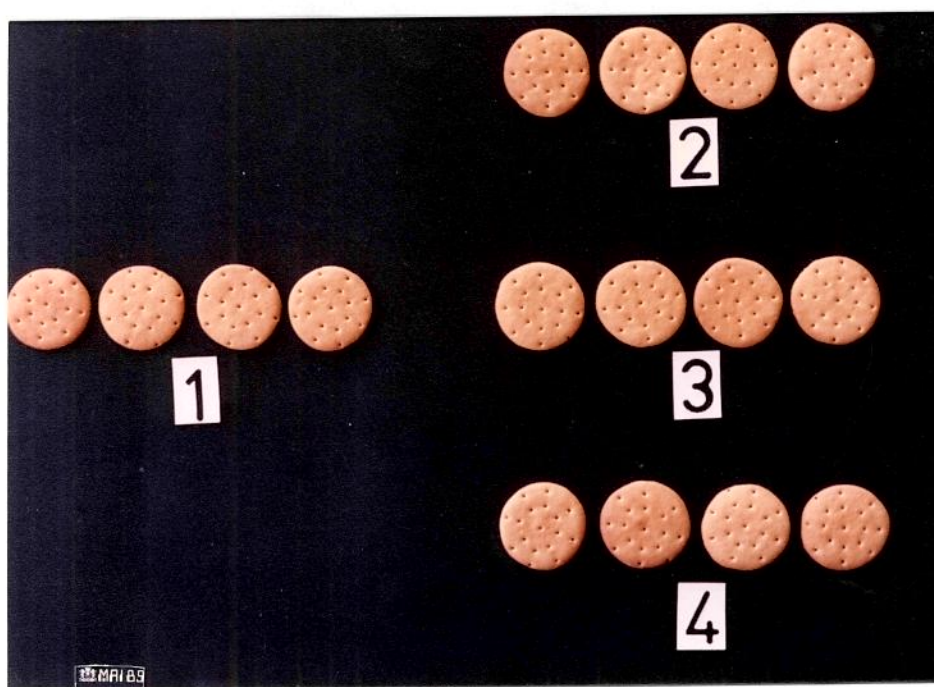


Figura 5 - Biscoitos produzidos em laboratório:

- 1 - Tratamento-padrão com bissulfito de sódio;
- 2 - Tratamento com protease bacteriana à temperatura de mistura de 33°C e sem descanso;
- 3 - Tratamento com protease bacteriana à temperatura de mistura e descanso de 33°C;
- 4 - Tratamento com protease bacteriana à temperatura de mistura e descanso de 38°C.

9 - Processamento dos Biscoitos Semidoces Duros na Indústria

Na tentativa de reproduzir na indústria as condições de processamento estabelecidas em laboratório, para a massa-padrão e para as massas com protease bacteriana, foram necessárias adaptações na formulação, com relação aos teores de água e bissulfito ou protease adicionados. Os ajustes foram feitos visando à obtenção de massas com características viscoelásticas adequadas e temperaturas finais de mistura próximas de 40°C.

9.1 - Preparo da Massa-Padrão

Com os testes preliminares foram reduzidas as concentrações de bissulfito de sódio de 1000 ppm para 500 ppm, e de água, de 25% para 22,5%. Foi também necessário usar água resfriada à temperatura de 17°C, para evitar que a temperatura da massa ultrapassasse 40-42°C no final da mistura.

Nessas condições, foram preparadas duas bateladas de massa à temperatura ambiente de 32°C. As temperaturas de adição do açúcar invertido e da gordura foram de 40 e 53°C, respectivamente.

Foi realizado o controle de temperatura durante a mistura, obtendo-se os seguintes perfis de temperatura para as massas 1 e 2:

Massa 1		Massa 2	
Tempo (min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
5	31,1	5	32,7
10	33,3	10	34,1
15	34,6	15	35,3
20	36,1	20	36,9
25	37,2	25	38,5
30	38,1	30	39,2

Após a mistura, as massas foram conduzidas diretamente para a moega alimentadora, sem período de descanso. O pH das massas 1 e 2 foi determinado, encontrando-se os valores de 7,9 e 8,0, respectivamente.

9.2 - Preparo da Massa com Protease Bacteriana sem Descanso

O primeiro teste com a protease bacteriana foi realizado nas mesmas condições determinadas anteriormente para a massa-padrão, ou seja, usando-se água a uma concentração de 22,5% em relação à farinha e à temperatura de 17°C. Foram adicionados à massa 500 ppm de protease bacteriana, concentração esta igual à de bissulfito de sódio usada no preparo da massa-padrão na indústria. Essa quantidade inicial foi escolhida em função dos resultados obtidos no laboratório com massas sem descanso (item 7), em que se utilizou a mesma proporção de protease ou de bissulfito para produzir os biscoitos à temperatura de mistura de 33°C. Foram necessárias algumas adaptações, devido às diferenças operacionais entre as condições laboratoriais e industriais, no que se refere principalmente ao controle da temperatura da massa durante a

mistura.

Nas condições mencionadas, a temperatura final de mistura foi de apenas 35,5°C, sendo observado que a massa não apresentou o aspecto liso e uniforme obtido com a massa-padrão nem as características de extensibilidade adequadas à laminação. Acredita-se que a diferença na temperatura final da massa com protease, em relação à massa-padrão, foi causada pela ação mais rápida do bissulfito de sódio na mistura, em relação à enzima. Observou-se que a massa com bissulfito adquiriu um aspecto homogêneo já nos primeiros 15 minutos de mistura, oferecendo maior resistência ao movimento das pás e gerando, dessa forma, um atrito mais intenso e maiores temperaturas finais de mistura. MENDER & BRETSCHNEIDER (1971) também observaram a ação mais rápida dos aditivos redutores, incluindo os sulfitos e derivados, em relação às enzimas proteolíticas.

Em função dos resultados apresentados, procurou-se intensificar a proteólise na massa, aumentando-se a concentração de protease bacteriana de 500 para 700 ppm e a temperatura da água de 17 para 34°C (temperatura ambiente). Com essas modificações, a temperatura final de mistura foi de 38°C e as características de extensibilidade foram superiores às do ensaio anterior, porém ainda inadequadas à laminação.

No último teste preliminar realizado com a protease bacteriana, foram usadas água à temperatura de 45°C e concentração de enzima de 800 ppm. Nessas condições, a massa apresentou temperatura de 41°C no final da mistura e características viscoelásticas adequadas à laminação, similares às da massa com bissulfito.

Os três testes preliminares realizados na indústria

permitiram evidenciar que maiores concentrações de protease e temperaturas finais de mistura mais elevadas favoreceram a proteólise na massa, o que mostrou a importância dessas duas variáveis na modificação das características reológicas das massas durante a mistura.

Foram, então, preparadas duas bateladas de massa, designadas de massas 1 e 2, à temperatura ambiente de 34°C, segundo as condições estabelecidas no último teste. As temperaturas de adição da gordura e do açúcar invertido foram de 52 e 44°C, respectivamente.

Foi realizado o controle de temperatura durante a mistura, obtendo-se os seguintes perfis de temperatura para as massas 1 e 2:

Massa 1		Massa 2	
Tempo (min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
5	35,2	5	36,4
10	36,7	10	37,4
15	37,7	15	38,2
20	38,7	20	39,2
25	39,5	25	40,5
30	41,0	30	41,9

Após a mistura, por problemas de escoamento na produção, houve para as massas um período de descanso não previsto, de aproximadamente 15 minutos, à temperatura ambiente, antes destas serem introduzidas no sistema de laminação. O pH das massas 1 e 2 foi determinado após a mistura, encontrando-se o valor de 8,4 para ambas.

9.3 - Preparo da Massa com Protease Bacteriana e com Descanso

O primeiro teste realizado com a protease bacteriana, introduzindo-se um período de descanso de 30 minutos após a mistura, foi conduzido nas mesmas condições estabelecidas para as massas sem descanso (item 9.2), reduzindo-se a concentração da enzima de 800 para 700 ppm. Nessas condições, a temperatura final de mistura foi de 41°C. Após 30 minutos de descanso, à temperatura ambiente de 32°C, a temperatura da massa caiu para 40°C. A massa assim produzida apresentou, após o descanso, características elásticas adequadas ao processamento, embora inferiores àquelas observadas nas massas com protease e sem descanso e na massa-padrão.

Foram, então, preparadas duas bateladas de massa para o processamento à temperatura ambiente de 33°C. As temperaturas de adição da gordura e do açúcar invertido foram de 50 e 44°C, respectivamente.

Foi realizado o controle de temperatura durante a mistura e o descanso, obtendo-se os seguintes perfis de temperatura para as massas 1 e 2:

Perfil de temperatura na mistura

Massa 1		Massa 2	
Tempo (min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
5	34,5	5	35,1
10	36,0	10	36,8
15	36,8	15	38,0
20	37,5	20	39,5
25	38,2	25	40,7
30	40,1	30	41,2

Perfil de temperatura no descanso

Massa 1		Massa 2	
Tempo (min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
5	40,9	5	41,4
10	40,2	10	40,6
15	40,1	15	40,3
20	40,0	20	40,1
25	39,9	25	40,0
30	39,8	30	40,0

Observou-se que durante os 30 minutos de descanso a temperatura ambiente, a temperatura das massas manteve-se praticamente constante.

Após o descanso de 30 minutos, as massas foram conduzidas ao sistema de laminação. O pH das massas 1 e 2 foi determinado após a mistura, encontrando-se os valores de 8,3 e 8,4, respectivamente.

10 - Caracterização dos Biscoitos Produzidos na Indústria

Os biscoitos produzidos em escala industrial na Companhia Campineira de Alimentos foram caracterizados através das determinações de pH e umidade, das medidas físicas e da análise sensorial.

10.1 - Umidade e pH

Os valores da umidade e do pH dos biscoitos são apresentados na tabela IX.

A faixa de controle da umidade final dos biscoitos usada pela "Campineira" é de 2 a 3%, na qual se encontram os 3 tratamentos realizados.

Os biscoitos produzidos nesta indústria apresentaram valores de pH bem próximos e dentro da faixa encontrada na literatura (6,5 a 8,0) para biscoitos em geral (PYLER, 1973).

TABELA IX

Umidade e pH dos Biscoitos Produzidos na Indústria

Tratamentos	Umidade (%)	pH
1) Padrão	2,0	7,0
	2,2	7,1
2) Protease	2,4	7,4
	2,0	7,3
3) Protease com descanso	2,0	7,2
	2,2	7,3

10.2 - Medidas Físicas

Os resultados das medidas físicas efetuadas em 6 conjuntos de 10 biscoitos para cada tratamento estão apresentados nas tabelas Xa e Xb.

A análise estatística mostrou que os 3 tratamentos não diferiram entre si, ao nível de 1% de significância, nos parâmetros massa dos biscoitos crus e massa dos biscoitos cozidos. As médias relativas à massa dos biscoitos crus foram de 52,9, 53,8 e 53,5 g para os tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente. Considerando-se que a massa de 10 biscoitos crus do tipo "Maizena" deve estar entre 53 e 54 g, concluiu-se que o controle nas etapas de laminação e formação foi satisfatório para os 3 tratamentos realizados. Analogamente, as médias relativas à massa dos biscoitos cozidos para os tratamentos 1, 2 e 3 foram de 42,5, 43,6 e 43,6 g, respectivamente. Segundo o controle adotado por essa indústria na etapa de cozimento, a massa de 10 biscoitos cozidos deve estar entre 43 e 44 g. Com exceção do tratamento 1 com bissulfito, os demais tratamentos com protease estão dentro da referida faixa. Entretanto, essa diferença do tratamento 1 em relação à faixa de controle para a massa dos biscoitos cozidos é muito pequena em termos práticos, estando dentro das flutuações registradas na produção normal da indústria em questão. As perdas ponderais no cozimento tiveram valores médios de 19,78, 19,08 e 18,40% para os tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente.

TABELA Xa

Medidas Físicas dos Biscoitos Produzidos na Indústria

Tratamentos	Massa dos bisc. crus (g)	Massa dos bisc. cozidos (g)	Espessura (cm)	Comprimento (cm)
1) Padrão	53,1	42,0	5,1	79,4
	52,2	41,5	5,0	79,2
	53,4	42,6	5,0	79,6
	53,0	42,7	4,9	79,2
	52,4	42,6	4,9	79,3
	53,4	43,3	4,8	79,3
2) Protease	54,6	43,6	4,8	82,7
	54,0	43,0	4,6	82,6
	52,9	45,2	4,8	83,3
	54,0	43,3	4,5	83,1
	53,9	42,9	4,5	82,1
	53,5	43,9	4,6	83,0
3) Protease com descanso	53,0	42,1	5,1	80,2
	54,0	41,9	5,1	79,9
	53,4	44,4	5,1	80,0
	53,2	44,5	5,2	79,9
	53,9	44,2	5,3	79,6
	53,3	44,7	5,1	80,0

TABELA Xb

Medidas Físicas dos Biscoitos Produzidos na Indústria

Tratamentos	Largura (cm)	Volume ^s (cm ³)	Densidade (g/cm ³)
1) Padrão	31,0	113,0	0,372
	31,2	115,0	0,361
	31,1	114,0	0,374
	31,1	114,3	0,374
	30,9	111,0	0,384
	30,9	114,3	0,379
2) Protease	31,7	106,5	0,409
	31,6	105,8	0,406
	31,5	108,8	0,415
	31,6	107,0	0,405
	31,5	107,3	0,400
	31,5	107,5	0,408
3) Protease com descanso	30,9	114,3	0,368
	30,7	109,6	0,382
	30,8	110,3	0,403
	31,0	110,3	0,403
	30,8	111,5	0,396
	30,7	112,5	0,397

^sO desvio-padrão do método de determinação do volume foi de 6,2 cm³.

A análise estatística também mostrou que todos os tratamentos diferiram entre si, ao nível de 1% de significância, nos parâmetros comprimento e largura dos biscoitos. As médias do comprimento de 10 biscoitos para os tratamentos 1, 2 e 3 foram de 79,3, 82,8 e 79,9 cm, respectivamente. Analogamente, as médias para a largura foram de 31,0, 31,6 e 30,8 cm, respectivamente. Considerando-se que as dimensões preestabelecidas para o biscoito tipo "Maizena" são de aproximadamente 8 cm de comprimento e 3 cm de largura, notou-se que os tratamentos 1 e 3 forneceram biscoitos com valores mais próximos dos ideais. Por outro lado, os biscoitos do tratamento 2 apresentaram os maiores valores de comprimento e largura.

Quanto ao parâmetro espessura, a análise estatística mostrou que o tratamento 2 diferiu, ao nível de 1% de significância, dos demais tratamentos. As médias obtidas foram de 5,0, 4,6 e 5,2 para os tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente. Considerando-se que a faixa de controle da indústria para a espessura de 10 biscoitos é de 5,0 a 5,1 cm, notou-se que os tratamentos 1 (padrão) e 3 (protease com descanso) apresentaram os melhores resultados. Os menores valores de espessura dos biscoitos produzidos segundo o tratamento 2 (protease sem descanso) foram provavelmente causados pelo tempo de descanso imprevisto das massas, de aproximadamente 15 minutos entre o fim da mistura e o início da laminação. Acredita-se que esse período adicional propiciou uma maior atividade proteolítica nas massas e, conseqüentemente, modificações nas suas características viscoelásticas, aumentando principalmente a sua extensibilidade. Dessa forma, após a laminação e na fase inicial do cozimento, os biscoitos se estenderam por uma região de maior área, antes de

adquirir uma estrutura rígida, o que provocou uma diminuição na espessura dos mesmos. Certamente, isso foi também responsável pelos maiores valores de comprimento e largura obtidos para os biscoitos do tratamento 2.

Através de análise estatística, concluiu-se que o tratamento 2 diferiu dos demais, ao nível de 1% de significância, com relação ao parâmetro volume dos biscoitos. As médias obtidas foram de 113,6, 107,2 e 112,4 cm³ para os tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente. Observou-se que os biscoitos do tratamento 2 apresentaram os menores valores de espessura e volume.

Em relação ao parâmetro densidade, concluiu-se que os tratamentos 1 e 2 diferiram entre si, ao nível de 1% de significância. As médias obtidas para os tratamentos 1, 2 e 3 foram de 0,374, 0,407 e 0,392 g/cm³, respectivamente. A menor espessura dos biscoitos do tratamento 2, associada à sua maior massa, acarretou uma maior densidade dos mesmos.

Os resultados dos testes industriais mostraram ser possível a produção de biscoitos com protease com características físicas similares às obtidas com o bissulfito de sódio, o que está de acordo com os resultados prévios obtidos em laboratório. Os testes na indústria também evidenciaram a importância de se controlar o tempo de descanso das massas após a mistura, a fim de se evitar o ocorrido com o tratamento 2, que sofreu uma proteólise excessiva. Portanto, a concentração de protease adicionada à massa e o tempo de descanso após a mistura são variáveis importantes, devendo ser controladas criteriosamente no processamento industrial de biscoitos.

10.3 - Análise Sensorial

Os resultados da análise sensorial envolvendo os 3 tratamentos realizados na indústria estão apresentados na tabela XI.

De um modo geral, os 3 tratamentos obtiveram pontuações consideradas muito boas nos parâmetros analisados, tendo em vista que a escala usada era de 1 a 10 pontos.

A avaliação estatística dos resultados mostrou que, em relação ao aroma dos biscoitos, o tratamento 1 com bissulfito de sódio diferiu dos demais, ao nível de 1% de significância, recebendo a maior pontuação. Esses resultados estão de acordo com o que se observou em laboratório, quando foi notada uma leve alteração no aroma dos biscoitos produzidos com protease em relação ao padrão.

Quanto ao sabor, os tratamentos 1 e 3 obtiveram a maior pontuação, diferindo do tratamento 2 ao nível de 1% de significância.

Com relação à crocância, concluiu-se que o tratamento 2 diferiu dos demais, ao nível de 1% de significância, obtendo a menor pontuação. Acredita-se que isso esteja associado à menor espessura e à maior densidade desses biscoitos, o que, provavelmente, conferiu aos mesmos uma maior dureza. Embora os biscoitos produzidos com bissulfito de sódio no laboratório tenham obtido a menor nota para a crocância, isso não se verificou em escala industrial. A laminação na indústria envolve, além dos rolos laminadores, uma etapa de formação de dobras, que contribui para melhorar a textura do produto final (AICHELE, 1981). Isso provavelmente justifica as diferenças encontradas na crocância

TABELA XI

Análise Sensorial dos Biscoitos Produzidos na Indústria

Parâmetros	Nota média dos tratamentos			Teste
	1) Padrão	2) Protease	3) Protease c/ descanso	F
Aroma	8,7	8,0	8,3	10,0**
Sabor	8,7	8,3	8,7	13,6**
Crocância	8,9	8,4	9,0	9,3**
Preferência	8,8	8,1	8,7	12,9**

** Houve diferença significativa entre os tratamentos, a nível de 1% de significância.

para os biscoitos com bissulfito de sódio produzidos na indústria e no laboratório, uma vez que no laboratório não foi feita a formação de dobras.

O tratamento 2 diferiu, ao nível de 1% de significância, dos demais tratamentos no parâmetro preferência. Esse resultado decorreu, provavelmente, das menores pontuações obtidas por esse tratamento em todos os parâmetros analisados, principalmente no que se refere ao sabor.

Todos os parâmetros sensoriais apresentados foram avaliados com mascaramento de cor pela equipe de provadores. A cor dos biscoitos é também um parâmetro importante na avaliação da qualidade e está diretamente relacionada às condições de cozimento. Entretanto, esse parâmetro não foi avaliado nesse estudo porque os tratamentos foram realizados em diferentes dias na indústria e, portanto, em condições de cozimento não necessariamente idênticas. Os biscoitos produzidos na indústria segundo os 3 tratamentos apresentaram coloração típica, porém com pequenas diferenças, como pode ser observado na figura 6.

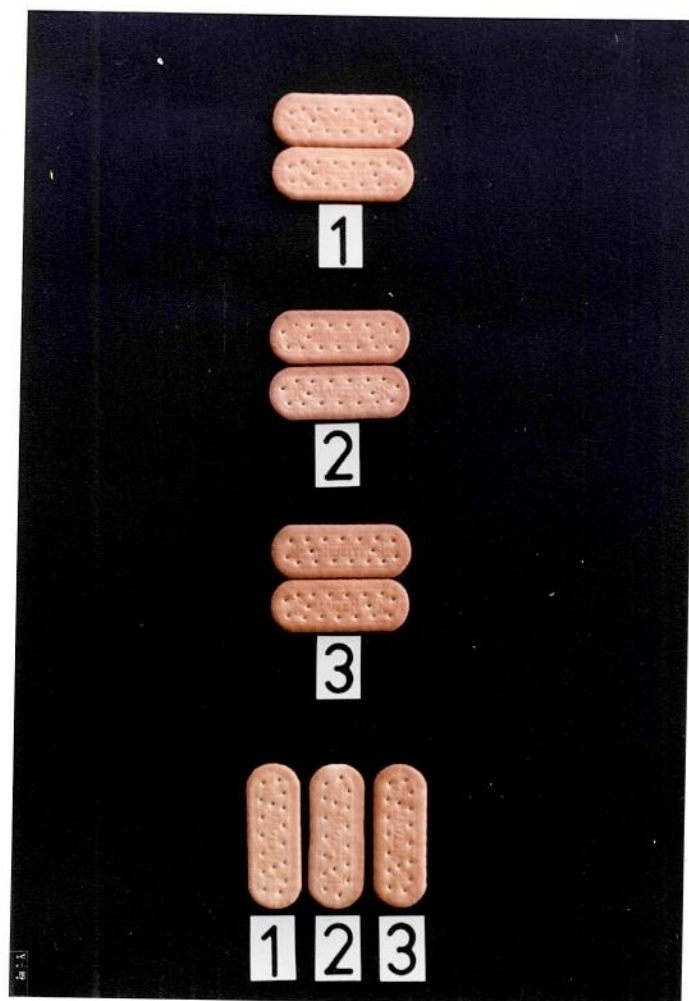


Figura 6 - Biscoitos produzidos na indústria:

- 1 - Tratamento-padrão com bissulfito de sódio
- 2 - Tratamento com protease bacteriana
- 3 - Tratamento com protease bacteriana e com descanso

V - CONCLUSÕES

1 - Pela análise dos parâmetros extensográficos e farinográficos das massas de biscoito com adição de protease, foram selecionadas a resistência à extensão (RE) e a resistência máxima (RM), determinadas no extensógrafo, como indicadores da intensidade de proteólise na massa.

2 - A protease de origem bacteriana (Bacillus subtilis) foi mais eficaz na degradação do glúten na massa de biscoito do que a fúngica (Aspergillus oryzae). Foi necessária uma concentração de protease fúngica cerca de 5 vezes superior à bacteriana, para reproduzir os valores de RE e RM da massa com bissulfito de sódio (massa-padrão), à temperatura de 33°C.

3 - A introdução de um período de descanso de 30 minutos após a mistura, à temperatura de 33°C, para as massas de biscoito, intensificou a proteólise na massa, o que provocou uma redução nos valores de RE e RM em relação às massas sem descanso. Consequentemente, obteve-se, com o descanso, uma redução de aproximadamente 15% na concentração de protease bacteriana necessária para substituir o bissulfito de sódio.

4 - O estudo da influência do pH na proteólise mostrou que o pH natural da massa ($8,45 \pm 0,05$) correspondeu ao pH ótimo de ação da protease bacteriana na massa, à temperatura de 33°C.

5 - O aumento de 5°C (33 para 38°C) nas temperaturas de mistura e descanso das massas de biscoito intensificou a proteólise na

massa, o que causou uma redução nos valores de RE e RM em relação às massas a 33°C. Como consequência, obteve-se, com o aumento de temperatura, uma redução de aproximadamente 50% na concentração de protease bacteriana necessária para substituir o bissulfito de sódio.

6 - As características físicas dos biscoitos semidoces duros produzidos em laboratório não diferiram entre si, ao nível de 1% de significância, em 8 dos 9 parâmetros de qualidade analisados. A única exceção se referiu às perdas ponderais no cozimento e resfriamento.

7 - A avaliação da qualidade dos biscoitos produzidos em laboratório mostrou que os quatro tratamentos estudados apresentaram características semelhantes com relação à cor, forma e sabor. Entretanto, o aroma dos biscoitos com bissulfito de sódio foi considerado mais agradável do que os demais, embora a sua crocância tenha sido inferior à dos biscoitos com protease.

8 - Os biscoitos produzidos na indústria com protease bacteriana e com descanso (tratamento 3) apresentaram características físicas similares às obtidas com bissulfito de sódio (tratamento 1). As diferenças apresentadas pelos biscoitos produzidos com protease sem descanso (tratamento 2), em relação aos tratamentos 1 e 3, foram decorrentes de uma proteólise excessiva durante o tempo de descanso imprevisto entre o fim da mistura da massa e o início da laminação.

9 - A análise sensorial dos biscoitos industriais mostrou que o tratamento com protease bacteriana sem descanso diferiu dos demais, ao nível de 1% de significância, nos parâmetros sabor, crocância e preferência, obtendo a menor pontuação. Entretanto, de um modo geral, os três tratamentos obtiveram pontuações consideradas muito boas em todos os parâmetros analisados.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. 7 ed. St. Paul, 1960. v. 1 e 2.

ABIA. Compêndio de legislação de alimentos: consolidação das normas e padrões de alimentos. São Paulo, 1988. v. 1. (Resolução nº 4 do Conselho Nacional de Saúde de 24/11/1988).

AICHELE, W. J. Cookie and cracker processing. Cereal Foods World. 26 (4): 161 - 165, 1981.

AMOS, A. J. The use of enzymes in the baking industry. J. Sci. Food. Agric. 6: 489 - 495, 1955.

BARRETT, F. F. Enzyme uses in the milling and baking industries. In: REED, G. Enzymes in food processing. 2 ed. New York, Academic Press, 1975. cap. 11, p. 301 - 330.

BERGER, M.; GRANDVOINET, P.; GUÉRIVIÈRE, J.-F. de la; BUSSIÈRE, G. Tests de rhéologie pratique utilisables pour l'appréciation des activités protéolytiques. Ann. Technol. Agric. 23 (2): 233 - 239, 1974.

BLIGH, E. G. & DYER, W.D. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canad. J. Biochem. 37: 911, 1959.

BOBBIO, P. A. e BOBBIO, F.O. Química do processamento de

alimentos. Campinas, Fundação Cargill, 1984. cap. 7. p.161 - 178.

COLAS, A. Tests de rhéologie pratique utilisables pour l'appréciation des activités protéolytiques. Ann. Technol. Agric. 23 (2): 241 - 247, 1974.

COLE, M. S. An overview of modern dough conditioners. Bak. Dig. 47 (6): 21 - 23, 64, 1973.

COURTOIS, J.-É. Évolution et perspectives nouvelles de l'emploi des enzymes dans les industries agricoles et alimentaires. Ann. Technol. Agric. 21 (3): 221 - 235, 1972.

DELECOURT, R. Purification et propriétés des protéases bactérienne ou fongique. Ann. Technol. Agric. 23 (2): 193 - 203, 1974.

DIAZ, N. A. M. Enzimas em panificação. In: VITTI, P. Coord. Seminário sobre o uso de enzimas em biscoitos e panificação. Campinas. ITAL, 1988. p. 19 - 26.

DRAPRON, R. Réactions enzymatiques en milieu peu hydraté. Ann. Technol. Agric. 21 (4): 487 - 499, 1972.

DUCROO, P. Étude de l'action des protéases sur la farine de blé au moyen du farinographe Brabender. Ann. Technol. Agric. 23 (2): 249 - 256, 1974.

EL DASH, A. A.; DIAZ, N. A. M. ; CAMARGO, C. R. O. Fundamentos da

tecnologia de panificação. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1982. cap. 14, p. 307 - 318. (Série Tecnologia Agroindustrial, 6).

EL DASH, A. A. & JOHNSON, J. A. Protease enzymes: effect on bread flavor. Cereal Sci. Today. 12 (7): 282 - 288, 1987.

FOX, P. F. & MULVIHILL, D. M. Enzymes in wheat, flour and bread. In: POMERANZ, Y. Advances in Cereal Science and Technology. ed. St. Paul, Minnesota. AACC, 1982. v. 5, cap. 3. p. 107-156.

GABOR, R.; TAUFEL, A. e RUTTLOFF, H. Zur Wirkungsweise verschiedener mikrobieller Proteasepräparate auf Weizengluten und -mehl. Die Nahr. 26 (1): 37 - 46, 1982.

GAMS, T. C. Der Einsatz von mikrobiellen Enzymen in der Bäckerei. Getreide, Mehl und Brot. 30 (5): 113 - 118, 1976.

GORTON, L. What happens while cookies bake? Bak. Dig. 58 (4): 12, 16, 1984.

GRANDVOINET, P. & BERGER, M. Action de réducteur et d'oxydant dans les produits de cuisson à base de farine de blé. Ann. Technol. Agric. 28 (3): 287 - 297, 1979.

GREEN, J. R. & MARGERISON, D. Statistical treatment of experimental data. ed. Amsterdam, Elsevier scientific publishing company, 1978. cap. 8, p. 149 - 166. cap. 9, p. 167 - 172.

GRODNER, R. M. Enzymes: past, present and future. Cereal Foods World. 21 (11): 574 - 576, 1976.

GUÉRIVIÈRE, J.-F. de la. Utilisation d'amylases en panification fine et de protéases en biscuiterie sèche. Ann. Technol. Agric. 21 (3): 253 - 266, 1972.

GUÉRIVIÈRE, J.-F. de la & BUSSIÈRE, G. Utilisation des protéases dans les industries de cuisson de céréales. Ann. Technol. Agric. 23 (2): 257 - 268, 1974.

GUILBOT, A. Emploi des enzymes dans les industries de cuisson des produits à base de céréales. Ann. Technol. Agric. 21 (3): 237 - 252, 1972.

HARTLEY, B. S. Proteolytic enzymes. Ann. Rev. Biochem. 29: 47 - 72, 1960.

HASEBORG, E. ter. Enzymes in flour and baking applications, especially waffle batters. Process Biochem. 16 (5): 16 - 17, 1981.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo, 1976. v. 1, p. 24.

JOHNSON, J. A. Enzymes in wheat technology in retrospect. Cereal Sci. Today. 10 (6): 315 - 319, 1965.

- JOHNSON, J. A. & MILLER, B. S. The relationship between dough consistency and proteolytic activity. Cereal Chem. 30 (6): 471 - 479, 1953.
- LANDIS, Q. An index of proteolytic activity by the use of the farinograph. Cereal Chem. 12: 25 - 33, 1935.
- LÖFFLER, A. Proteolytic enzymes: sources and applications. Food Technol. 40 (1): 63 - 70, 1986.
- LYONS, T. P. Proteinase enzymes relevant to the baking industry. Biochem. Soc. Trans. 10 (4): 287 - 290, 1982.
- MANSOUR, K. H. Quality control in soft wheat flour. Cereal Foods World. 27 (7): 315 - 316, 1982.
- MENGER, A. & BRETSCHNEIDER, F. Teigerverweichung bei der Herstellung von Keksen. Brot und Gebäck. 25 (12): 237 - 243, 1971.
- MONNIER, B. & GODON, B. Utilisation des protéases dans les industries de cuisson. Ind. Alim. et Agric. 92 (5): 521 - 529, 1975.
- NEGRILLO, B. G. & GONÇALVES, E. B. Métodos estatísticos em controle de qualidade na indústria de alimentos. Campinas, F. T. P. T. "André Tosello", 1985. 210 p.
- PETIT, L. Étude critique des méthodes chimiques de dosage des activités protéolytiques. Ann. Technol. Agric. 23 (2): 223 -

231, 1974.

PETIT, L. & AUDIDIER, Y. Action des protéinases dans les industries de cuisson. Ann. Nutr. Alim. 21 (6): 341 - 360, 1967.

POMERANZ, Y.; RUBENTHALER, G. L.; FINNEY, K. F. Evaluation of the effects of proteolytic enzymes on bread flour properties. Food Technol. 20 (3): 95 - 98, 1966.

PRATT, D. B. Jr. Criteria of Flour Quality. In: POMERANZ, Y. Wheat chemistry and technology. 2 ed. St. Paul, Minnesota. AACC, 1978. cap. 5, p. 201 - 226.

PYLER, E. J. Baking science & technology. 2 ed. Chicago, Siebel Publishing Company, 1973. v.1, cap. 4, p. 143 - 163, cap. 6, p. 253 - 260, cap. 7, p. 286 - 366. v.2, cap. 21, p. 834 - 897.

RANUM, P. M.; BARRETT, F. F.; LOEWE, R. J.; KULP, K. Nutrient levels in internationally milled wheat flours. Cereal Chem. 57 (5): 361 - 366, 1980.

REED, G. Enzyme supplementation in baking. Bak. Dig. 41 (5): 84 - 87, 123, 1967.

SHELLENBERGER, J.A. Historical development of the application of fungal and bacterial enzymes to the baking industry. Cereal Sci. Today. 16 (4): 114 - 117, 1971.

- SPRÖBLER, B. Wirkung von Proteinase beim Zusatz zum Mehl.
Getreide, Mehl und Brot. 35 (3): 60 - 62, 1981.
- STAUFFER, C. E. Dough Conditioners. Cereal Foods World. 28 (12):
729 - 730, 1983.
- STEWART, J. Snack cracker production: how to choose ingredients
and methods. Bak. Dig. 58 (4): 20,22,24, 1984.
- TANILLI, V. H. Characteristics of wheat and flour for cookie and
cracker production. Cereal Foods World. 21 (12): 624 - 625, 627
- 628, 644, 1976.
- UHLIG, H. & SPRÖBLER, B. Die natürlichen Enzyme des Getreides und
ihre Ergänzung durch mikrobiologische Enzympräparate. Die Mühle
und Mischfüttertechnik. 109 (15): 221 - 223, 1972.
- VITTI, P. Coord. Seminário sobre o uso de enzimas em biscoito e
panificação. Campinas, ITAL, 1988. 57 p.
- VITTI, P.; GARCIA, E. E. C.; OLIVEIRA, L. M. Tecnologia de
Biscoitos. Manual técnico nº 1. Campinas, ITAL, 1988. 86 p.
- WADE, P. Technological aspects of the use of sodium metabisulphite
in the manufacture of semi sweet biscuits. Food Trade Rev. 40:
34 - 39, 1970.
- ZELENY, L. Criteria of wheat quality. In: POMERANZ, Y. Wheat
chemistry and technology. 2 ed. St. Paul, Minnesota. AACC,

1978. cap. 2. p. 10 - 40.