

**Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Engenharia de Alimentos**

**ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE PROTEASES  
FÚNGICA E BACTERIANA NAS CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS  
DA MASSA E NA QUALIDADE DO BISCOITO TIPO CRACKER**

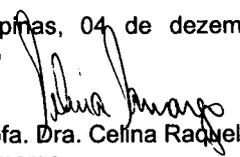
**PARECER**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Dorasilvia Pontes Lima Aprovada pela Comissão Julgadora em 04 de dezembro de 1998.

**DORASILVIA PONTES LIMA**

**Engenheira Química**

Campinas, 04 de dezembro de 1998

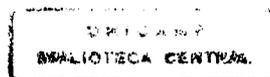
  
Prof. Dra. Celina Raquel de O.  
Camargo  
Presidente da Banca

**PROFa. Dra. CELINA RAQUEL DE OLIVEIRA CAMARGO**

**Orientadora**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos – Área de Tecnologia de Alimentos

Campinas – SP  
1998



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex
TÍTULO	36310
EX. Nº	229/99
	<input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	27/01/99
N.º CPD	

CM-00120202-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

L628e

Lima, Dorasilvia Pontes

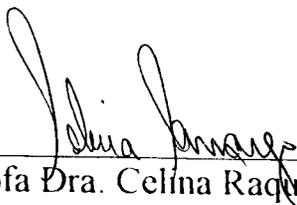
Estudo comparativo do efeito da adição de proteases fúngica e bacteriana nas características reológicas da massa e na qualidade do biscoito tipo cracker / Dorasilvia Pontes Lima. – Campinas, SP: [s.n.], 1998.

Orientador: Celina Raquel de Oliveira Camargo

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Cracker – Fermentação. 2.Enzimas proteolíticas.  
3.Cracker – Testes. I.Camargo, Celina Raquel de Oliveira.  
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de  
Engenharia de Alimentos. III.Título.

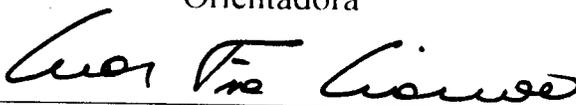
BANCA EXAMINADORA,



---

Prof. Dra. Celina Raquel de Oliveira Camargo

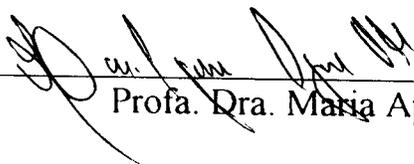
Orientadora



---

Prof. Dr. César Francisco Ciacco

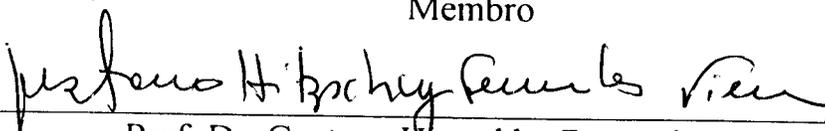
Membro



---

Prof. Dra. Maria Aparecida Azevedo Pereira da Silva

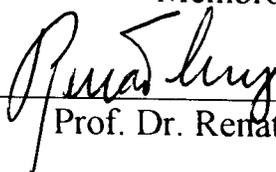
Membro



---

Prof. Dr. Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira

Membro



---

Prof. Dr. Renato Cruz

Membro

---

Prof. Dr. Geraldo Arraes Maia

Membro

---

Prof. Dr. Gil Eduardo Serra

Membro

Campinas, de dezembro de 1998

## Agradecimentos

À Prof.<sup>a</sup> **Dra. Celina Raquel de Oliveira Camargo**, pela orientação valiosa e imprescindível no desenvolvimento deste trabalho.

À **Universidade Federal do Ceará**, pela oportunidade concedida para realização do curso de doutorado.

À **Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP**, e **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – CAPES**, pelo apoio financeiro.

À Banca Examinadora pelas críticas e sugestões.

Aos professores **Dr. Carlos Alberto Gasparetto**, **Dra. Hélia Harumi Sato**, **Dra. Telma Texeira Franco** e pesquisadores **Dra Vera Lúcia Pupo Ferreira** e **Alexandre Nunes Ponezi**, pela ajuda descomprometida e segura no desenrolar dessa pesquisa.

À Prof.<sup>a</sup> **Eliana Miranda Sampaio**, pela ajuda valiosa na análise estatística dos dados discutidos nesse trabalho.

À bolsista de iniciação científica **Flávia de Assis e Souza**, pela sua dedicação no desenvolver dessa pesquisa.

Aos **professores, funcionários e colegas** do Laboratório de Cereais – Departamento de Tecnologia de Alimentos – UNICAMP, por terem me proporcionado um excelente ambiente de trabalho.

Ao meu **pai**, pelo grande exemplo de vida, que me serviu de estímulo em muitos momentos decisivos.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>x</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>xii</b>
<b>I.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>II.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
1. A QUALIDADE DA FARINHA DE TRIGO .....	3
1.1. Tipos de trigo.....	3
1.2. Força da farinha de trigo.....	4
1.3. Avaliação da qualidade da farinha .....	5
2. O PROCESSO DE PRODUÇÃO DO BISCOITO TIPO <i>CRACKER</i> .....	6
2.1. Ingredientes usados na formulação de crackers .....	7
2.1.1. Água .....	7
2.1.2. Fermento biológico.....	8
2.1.3. Gordura.....	9
2.1.4. Sal (Cloreto de sódio).....	10
2.1.5. Bicarbonato de sódio .....	11
2.1.6. Outros ingredientes.....	11
2.2. Fluxograma.....	12
2.3. Etapas do processo .....	14
2.3.1. Fase esponja: mistura e fermentação .....	14
2.3.2. Fase massa: mistura e fermentação.....	16
2.3.3. Laminação e corte .....	17
2.3.4. Cozimento.....	18
2.3.5. Resfriamento e empacotamento .....	19
3. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS.....	20
3.1. Atividade enzimática .....	21
3.2. Mecanismo de ação das proteases.....	26

3.3.	<i>Fontes</i> .....	28
4.	USO DE PROTEASES NA INDÚSTRIA DE PANIFICAÇÃO .....	30
4.1.	<i>Efeito nas proteínas do glúten</i> .....	31
4.1.1.	Modificações na força (elasticidade e extensibilidade) e consistência da massa .....	31
4.1.2.	Modificações na solubilidade, viscosidade das proteínas e perfis eletroforéticos das proteínas .....	33
4.2.	<i>Efeito nos tempos de mistura</i> .....	34
4.3.	<i>Efeito no produto final</i> .....	35
4.3.1.	Efeitos na cor e sabor .....	35
4.3.2.	Efeito na textura .....	37
<b>III.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
<b>A.</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>39</b>
1.	MATÉRIA PRIMA .....	39
2.	REAGENTES E INGREDIENTES .....	39
3.	APARELHOS E EQUIPAMENTOS .....	40
<b>B.</b>	<b>MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
1.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA, FÍSICO-QUÍMICA E REOLÓGICA DA FARINHA DE TRIGO .....	41
1.1.	<i>Umidade</i> .....	41
1.2.	<i>Proteínas</i> .....	42
1.3.	<i>Cinzas</i> .....	42
1.4.	<i>Lipídios</i> .....	42
1.5.	<i>Número de queda</i> .....	42
1.6.	<i>pH</i> .....	42
1.7.	<i>Glúten úmido e seco</i> .....	42
1.8.	<i>Avaliação das propriedades de mistura da massa</i> .....	42
1.9.	<i>Avaliação das propriedades extensográficas da massa</i> .....	43
2.	PROCESSAMENTO E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO CRACKER .....	43
2.1.	<i>Formulação</i> .....	44

2.2. <i>Mistura e fermentação da esponja</i> .....	44
2.3. <i>Mistura e fermentação da massa</i> .....	45
2.4. <i>Laminação e corte da massa</i> .....	45
2.5. <i>Cozimento e resfriamento</i> .....	47
3. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS CRACKERS PROCESSADOS EM LABORATÓRIO.....	48
3.1. <i>Determinação do pH</i> .....	48
3.2. <i>Determinação da Umidade</i> .....	48
3.3. <i>Medidas físicas do produto</i> .....	48
3.3.1. <i>Peso dos crackers crus (g)</i> .....	48
3.3.2. <i>Peso dos crackers cozidos e resfriados (g)</i> .....	49
3.3.3. <i>Espessura dos crackers (cm)</i> .....	49
3.3.4. <i>Comprimento dos crackers (cm)</i> .....	49
3.3.5. <i>Largura dos crackers (cm)</i> .....	49
3.3.6. <i>Volume dos crackers (cm<sup>3</sup>)</i> .....	49
3.4. <i>Análises instrumentais</i> .....	50
3.4.1. <i>Análise de textura</i> .....	50
3.4.2. <i>Análise de Cor</i> .....	50
4. AVALIAÇÃO DAS MUDANÇAS NA ESPONJA E NA MASSA DO CRACKER DURANTE A FERMENTAÇÃO NOS ENSAIOS EXPERIMENTAIS.....	52
4.1. <i>Preparo da esponja e da massa do cracker</i> .....	52
4.2. <i>Determinação das propriedades extensográficas das massas de cracker</i> .....	52
4.3. <i>Determinação do pH das esponjas e das massas do cracker</i> .....	53
4.4. <i>Extração das proteínas das massas fermentadas</i> .....	53
4.5. <i>Determinação da solubilidade das proteínas das massas fermentadas</i> .....	55
4.6. <i>Medida de viscosidade das proteínas da massa fermentada</i> .....	56
4.7. <i>Eletroforese das proteínas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)</i> .....	58
4.7.1. <i>Preparo dos géis de SDS-PAGE</i> .....	58
4.7.2. <i>Preparação das amostras</i> .....	59
4.7.3. <i>Eletroforese</i> .....	60
4.7.4. <i>Coloração de proteínas por Comassie Blue R - 250</i> .....	60
4.7.5. <i>Análise do gel SDS-PAGE</i> .....	60

5. ENSAIOS EXPERIMENTAIS.....	61
6. METODOLOGIA ESTATÍSTICA.....	63
<b>IV.RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
1. CARACTERIZAÇÃO DA FARINHA DE TRIGO .....	66
1.1.Composição centesimal da farinha de trigo.....	66
1.2.Análises físico-químicas.....	67
1.3.Testes reológicos.....	68
1.3.1.Características farinográficas .....	68
1.3.2.Avaliação das propriedades extensográficas da massa .....	69
2. EFEITO DA ADIÇÃO DE PROTEASES NO pH E NAS PROPRIEDADES EXTENSOGRÁFICAS DAS MASSAS do <i>cracker</i> .....	70
2.1.Efeito no pH.....	70
2.2.Efeito nas propriedades extensográficas .....	72
2.2.1.Tratamento T1 (Processo convencional).....	72
2.2.2.Tratamentos T2 e T3 .....	76
2.2.3.Tratamentos T4 e T5 .....	81
2.3.Estudo comparativo dos tratamentos (T1, T2, T3, T4 e T5) através dos <i>parâmetros extensográficos das massas durante a fermentação da esponja</i> .....	86
2.3.1.Resistência à extensão .....	86
2.3.2.Resistência máxima.....	88
2.3.3.Extensibilidade .....	90
2.3.4.Estudo comparativo dos parâmetros extensográficos das massas nos tratamentos T2, T3, T4 e T5 (após 12 horas de fermentação da esponja) e do processamento convencional (T1) após 18 horas de fermentação .....	92
3. EFEITO DA ADIÇÃO DE PROTEASES, FÚNGICA OU BACTERIANA, NAS CONDIÇÕES ESTABELECIDAS NOS ENSAIOS, NA SOLUBILIDADE, VISCOSIDADE E PERFIS ELETROFORÉTICOS DAS PROTEÍNAS DAS MASSAS DO <i>CRACKER</i> .....	94
3.1.Efeito da adição de proteases, fúngica ou bacteriana, na solubilidade das <i>proteínas das massas do cracker</i> .....	94

3.2.Efeito da adição de proteases, fúngica ou bacteriana na viscosidade dos extratos de proteínas da massa do cracker.....	97
3.2.1.Processo convencional.....	97
3.2.2.Processo com adição de proteases fúngica ou bacteriana.....	98
3.3.Efeito do tempo de fermentação da esponja do cracker, sem e com adição de proteases, no perfis eletroforéticos das proteínas totais.....	106
4. EFEITO DA ADIÇÃO DE PROTEASES, FÚNGICA OU BACTERIANA, NOS TRATAMENTOS T1, T2, T3, T4 E T5 NA QUALIDADE DOS <i>CRACKERS</i> .....	108
4.1.Avaliação da Qualidade dos <i>crackers</i> .....	108
4.1.1.Umididade e pH .....	108
4.1.2.Efeito dos tratamentos T1, T3 e T5 nas medidas físicas de dimensão e densidade dos <i>crackers</i> .....	109
4.1.3.Efeito dos tratamentos na cor e textura dos <i>crackers</i> avaliados por medidas instrumentais.....	115
<b>V.CONCLUSÕES.....</b>	<b>118</b>
<b>VI.APÊNDICES.....</b>	<b>121</b>
<b>VII.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>127</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Formulação do cracker .....	44
Tabela 2- Rotação, taxa de deformação e constante de multiplicação (K) utilizados no sistema MS-DIN 10-75 – Reômetro Contraves Rheomat 115 <sup>3</sup> .....	57
Tabela 3 - Materiais usados nos géis de separação e de concentração .....	58
Tabela 4 - Composição Centesimal da Farinha de Trigo .....	67
Tabela 5 - Características farinográficas da farinha de trigo .....	69
Tabela 6 – Parâmetros de extensão da farinha de trigo.....	69
Tabela 7 - Efeito do tempo de fermentação nos valores de pH <sup>1</sup> das esponjas do <i>cracker</i> , nas condições estabelecidas nos ensaios experimentais (T1, T2, T3, T4 e T5)..	70
Tabela 8 - Efeito do tempo de fermentação da esponja nos parâmetros extensográficos da massa do cracker no processo convencional.....	73
Tabela 9 - Efeito da adição de protease fúngica nos parâmetros extensográficos da massa do <i>cracker</i> durante a fermentação .....	77
Tabela 10 – Efeito da adição de protease bacteriana nos parâmetros extensográficos da massa do <i>cracker</i> durante a fermentação .....	82
Tabela 11 - Médias da resistência à extensão <sup>1,2</sup> (RE) da massa do cracker sem e com adição de proteases fúngica ou bacteriana .....	86
Tabela 12 - Médias da resistência máxima <sup>1,2</sup> da massa do <i>cracker</i> sem e com adição de proteases fúngica ou bacteriana .....	89
Tabela 13 – Médias da extensibilidade <sup>1</sup> da massa do cracker sem e com adição de proteases fúngica ou bacteriana .....	91
Tabela 14 – Médias dos parâmetros reológicos <sup>1,2</sup> da massa do cracker, nos tratamentos T2, T3, T4, T5 (após 12 horas de fermentação da esponja) e T1 (18 horas de fermentação da esponja).....	93
Tabela 15 – Efeitos dos tratamentos e tempos de fermentação da esponja nas solubilidades das proteínas em SDS (dodecil sulfato de sódio).....	94
Tabela 16 - Efeito do tempo de fermentação da esponja na viscosidade aparente do extrato de proteína, no processo convencional.....	97

Tabela 17 - Efeito da adição de proteases fúngica ou bacteriana, na viscosidade dos extratos de proteínas da massa durante a fermentação .....	98
Tabela 18 – Viscosidade aparente dos extratos de proteínas da massa do <i>cracker</i> no tempo final de fermentação dos tratamentos estudados.....	101
Tabela 19 - Viscosidade relativa dos extratos das proteínas das massas do cracker nos vários tempos de fermentação .....	104
Tabela 20 – Efeito da adição de proteases na esponja nos perfis eletroforéticos das proteínas da massa do cracker .....	107
Tabela 21 - Efeito da adição de proteases fúngica ou bacteriana no pH e na umidade dos <i>crackers</i> .....	109
Tabela 22 - Efeitos da adição de proteases fúngica ou bacteriana nas medidas físicas (dimensão e densidade) dos crackers processados .....	110
Tabela 23 - Parâmetros de cor (L, a* b*) dos crackers obtidos nos processos convencional (T1) e com adição de proteases fúngicas (T3) e bacteriana (T5) .	115
Tabela 24 - Medidas de dureza dos crackers obtidos pelo processo convencional T1 e pelos processos com adição de proteases fúngica T3 ou bacteriana T5 .....	117

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma da produção de Saltine cracker pelo processo esponja e massa. ...	13
Figura 2 – Diagrama de energia mostrando a redução de energia livre de ativação para uma reação catalizada.....	22
Figura 3 - Modelos de interação entre a enzima e substrato .....	24
Figura 4 - Efeito da redução (I), da oxidação (II) e da proteólise (III) no desenvolvimento da rede do glúten na massa. ....	27
Figura 5 – Seqüência das dobras e laminação da massa do <i>cracker</i> .....	46
Figura 6 – Moldador–cortador para <i>cracker</i> .....	47
Figura 7 – Esquema do Sistema CIE-LAB para cores.....	51
Figura 8 – Esquema para extração das proteínas das massas fermentadas liofilizadas .....	55
Figura 9 - Efeito da fermentação no pH das esponjas do cracker no processo convencional e na presença de proteases fúngica e bacteriana.....	71
Figura 10 - Efeito do tempo de fermentação da esponja na resistência à extensão da massa do cracker (processo convencional T1).....	74
Figura 11 - Efeito do tempo de fermentação da esponja na resistência máxima da massa do cracker (Processo convencional T1).....	74
Figura 12- Efeito do tempo de fermentação da esponja na extensibilidade da massa do cracker (Processo convencional T1) .....	75
Figura 13 - Efeito da protease fúngica nas concentrações 400ppm (T2) e 500ppm (T3) sobre a resistência à extensão das massas do <i>cracker</i> durante a fermentação. ...	78
Figura 14 - Efeito da protease fúngica nas concentrações 400ppm (T2) e 500ppm (T3) sobre a resistência máxima das massas do <i>cracker</i> durante a fermentação.....	79
Figura 15 - Efeito da protease fúngica nas concentrações 400ppm (T2) e 500ppm (T3) sobre a extensibilidade das massas do cracker durante a fermentação .....	80
Figura 16 - Efeito da protease bacteriana nas concentrações 200ppm (T4) e 250ppm (T5) sobre a resistência à extensão das massas do cracker durante a fermentação.....	83
Figura 17 - Efeito da protease bacteriana nas concentrações 200ppm (T4) e 250ppm (T5) sobre a resistência máxima das massas do <i>cracker</i> durante a fermentação. ....	84

Figura 18 - Efeito da protease bacteriana na concentração 200ppm (T4) sobre a extensibilidade massa do <i>cracker</i> durante a fermentação .....	85
Figura 19 - Comportamento da resistência à extensão da massa do <i>cracker</i> ao longo da fermentação, nos tratamentos estudados. ....	88
Figura 20 - Comportamento da resistência máxima da massa do <i>cracker</i> nos tratamentos estudados. ....	90
Figura 21 - Comportamento da extensibilidade da massa do <i>cracker</i> no período de fermentação nos tratamentos estudados .....	92
Figura 22 - Solubilidade das proteínas das massas do <i>cracker</i> , sem e com adição de proteases .....	96
Figura 23 - Efeito do tempo de fermentação da esponja na viscosidade aparente do extrato de proteína no processo convencional .....	98
Figura 24 - Efeito da protease fúngica nas concentrações 400ppm (T2) e 500ppm (T3) sobre a viscosidade dos extratos de proteínas da massa durante a fermentação. ....	100
Figura 25 - Efeito da adição de protease bacteriana 200ppm (T4) e 250ppm (T5) sobre a viscosidade das proteínas da massa durante a fermentação .....	101
Figura 26 - Representação gráfica da viscosidade aparente dos extratos de proteínas da massa nos tratamentos sem e com adição de proteases, durante a fermentação. ....	103
Figura 27 – Viscosidade relativa dos extratos da proteína das massas do <i>cracker</i> nos tratamentos estudados .....	105
Figura 28 - Eletroforese de proteínas totais das massas do <i>cracker</i> designadas por A, B, C, D, E, F.....	106
Figura 29 - Avaliação da redução do peso dos <i>crackers</i> crus após o cozimento .....	112
Figura 30 - Efeitos da adição de proteases fúngica ou bacteriana no volume dos <i>crackers</i> .....	113
Figura 31 – Efeitos da adição de protease fúngica ou bacteriana densidade dos <i>crackers</i> . ....	113
Figura 32 – <i>Crackers</i> processados em laboratório:.....	116

## RESUMO

Durante o longo período de fermentação da esponja, no processamento de *crackers*, ocorrem várias transformações que provocam a queda do pH e da resistência à extensão da massa. O enfraquecimento do glúten resultante, torna a massa adequada às etapas de laminação, formação e cozimento. Esta pesquisa objetivou estudar os efeitos da adição de proteases comerciais, fúngica e bacteriana, nas variáveis do processamento de *crackers*, nas propriedades da massa, e na qualidade do produto final. Para a obtenção do *cracker* foram desenvolvidas a formulação e as condições de processo em laboratório, usando-se o procedimento convencional esponja e massa, no qual os tempos de fermentação da esponja e da massa foram estabelecidos em 18 e 6 horas, respectivamente. Com relação as variáveis do processo, a adição das proteases fúngica (400 e 500ppm) e bacteriana (200 e 250ppm), diminuíram em 20% o tempo de mistura da massa, estabelecido no processo convencional, sem adição de proteases. Os tempos de fermentação da esponja e da massa foram também reduzidos em 33,3 e 50%, respectivamente, o que representou a redução de 9 horas no tempo total de produção de *crackers* (24 horas). A adição de proteases provocou mudanças nas massas fermentadas, medidas por parâmetros determinados no extensógrafo Brabender, pH, viscosidade e solubilidade das proteínas. As modificações reológicas sofridas, principalmente na elasticidade da massa, durante 18 horas de fermentação da esponja no processo convencional (sem adição de proteases) foram similares às obtidas nas massas com adição de protease fúngica (500ppm) e bacteriana (250ppm), durante 12 horas de fermentação da esponja. A presença das proteases na esponja, nas concentrações estudadas, causaram o abaixamento gradual do pH após 4, 8 e 12 horas de fermentação da esponja a valores próximos, porém superiores aos encontrados no processo convencional (sem adição de enzimas), comparando-se os mesmos tempos de fermentação. Com relação ao processo convencional, os resultados mostraram que a adição de proteases na esponja reduziu a viscosidade e aumentou a solubilidade das proteínas nas massas, a medida que o tempo de fermentação aumentou. Comparando-se a ação das proteases após 12 horas de fermentação da esponja, concluiu-se que a enzima

bacteriana (250ppm) foi a mais eficaz na redução da viscosidade dos extratos de proteínas, enquanto que a enzima fúngica (500ppm) foi a mais efetiva no aumento da solubilidade das mesmas. A qualidade dos *crackers* foi avaliada por medidas físicas (peso, comprimento, largura, espessura, volume e densidade) e por análises instrumentais (cor e textura). As médias das medidas físicas avaliadas nos *crackers* elaborados nos processos T3 (com protease fúngica, 500ppm) e T5 (com protease bacteriana, 250ppm), não diferiram entre si ao nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey, com exceção do volume e densidade. Em relação ao processo T1 (processo convencional), as médias dos pesos dos *crackers* não diferiram dos valores obtidos nos processos T3 e T5. Entretanto, as demais médias das medidas físicas apresentaram diferenças significativas. As massas contendo 500ppm de protease fúngica (T3) produziram *crackers* com maior volume e menor densidade, em relação aos do processo T1 e T5. A análise das medidas dos parâmetros de cor no sistema L, a\*, b\* dos *crackers* processados com protease fúngica (T3) foram similares as obtidas no processo convencional (T1). No entanto, foi observado que os biscoitos obtidos nos três tratamentos apresentaram aspecto e coloração atraentes. A avaliação instrumental da textura dos biscoitos, obtida no analisador de textura TA-XT2 mostrou que as médias dos valores de dureza, nos tratamentos com proteases (T3 e T5), não diferiram entre si, ao nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey, sendo porém diferentes (menores) das médias obtidas no processo convencional (T1). Portanto a adição de protease fúngica e bacteriana melhorou a textura dos biscoitos, considerando-se que a menor dureza é um atributo de qualidade desejável nos *crackers*.

## SUMMARY

During the long period of sponge fermentation, on the crackers' processing, the occurrence of several transformations causes the falling of the pH and the resistance to the extension of the dough. The resulting gluten weakness turns the dough appropriate for the steps of lamination, formation and baking. This research aimed to study the effects of the addition of commercial, fungal, and bacterial proteases in variables of the crackers' processing, in dough's properties and in the quality of the final product. In order to obtain the crackers, formulation and appropriate conditions of the process were developed in laboratory, using the conventional procedure of sponge and dough, allowing fermentation to take place on sponge and dough during 18 and 6 hours, respectively. In relation to the variables of the process, the addition of fungal (400 and 500ppm) and bacterial (200 and 250ppm) proteases reduced in 20% the time of the dough mixture, as established in the conventional process without the proteases addition. The period of the sponge and dough fermentation was reduced in 33.3 and 50%, respectively, representing a reduction of 9 hours in the total period of production of crackers (24 hours). The addition of proteases provoked changes in the fermented dough, measured by the rheological characteristics determined on the Brabender extensograph, pH, viscosity and solubility of proteins. The rheological changes occurred, mainly in the elasticity of the dough during 18 hours of sponge fermentation in the conventional process (without addition of proteases) were similar to those obtained in dough with addition of fungal (500ppm) and bacterial (250ppm) proteases during 12 hours of sponge fermentation. The presence of both types of proteases (fungal and bacterial) in the sponge, in the studied concentrations, caused the gradual decline of pH after 4.8 and 12 hours of the sponge fermentation to values close to but higher than the ones found in the conventional process (without addition of enzymes), comparing the same times of fermentation. In relation to the conventional process, the results showed that the addition of proteases to the sponge reduced the viscosity and increased the solubility of the proteins in the dough, as the time of fermentation increased. Comparing the action of the proteases after 12 hours of the sponge fermentation, it was concluded

that the bacterial enzyme (250ppm) was the most effective in the reduction of the protein viscosity, and the fungal enzyme (500ppm) was the most effective in the increase of their solubility. The quality of the crackers was evaluated by physical measurements (weight, length, width, thickness, volume and density) and by instrumental analysis (colour and texture). The average of the physical measurements of the crackers made in the processes T3 (with fungal protease, 500ppm) and T5 (with bacterial protease, 250ppm) did not differ among each other at the 0.05 significance level, using the Tukey test, with exception to volume and density. In relation to the process T1 (conventional process) the average of the variables of weight of the crackers did not differ from the values obtained in the processes T3 and T5. Nevertheless, the remaining averages of the physical measurements presented significant differences. The dough which contains 500ppm of fungal protease (T3) produced crackers with more volume and less density in relation to the processes T1 and T5. The analysis of colour parameter measurements in the system L, a\*, b\* of the crackers processed with fungal protease (T3) were similar to the ones obtained in the conventional process (T1), but the biscuits obtained by the three treatments presented attractive colour and appearance. The instrumental evaluation of the texture of the biscuits through the values of hardness obtained by the TA.XT2 Texture Analyzer, indicated that the averages of the values of hardness in treatments with proteases (T3 and T5) did not differ among each other, at the 0.05 significance level, using the Tukey test, but they indicate differences in the averages obtained in the conventional process (T1). The biscuits produced with addition of fungal and bacterial proteases presented the best texture, considering that less hardness is a desirable quality in crackers.

## I. INTRODUÇÃO

Os biscoitos tipo *cracker* são produzidos em maior variedade que qualquer outro tipo de produto de panificação. Estes biscoitos, diferem entre si pelas proporções de seus ingredientes principais: farinha de trigo, água, açúcar, gordura e outros elementos usados em menores quantidades.

A farinha de trigo é considerada o ingrediente mais importante no processamento de biscoitos, devendo conter teores de proteína relativamente baixos e propriedades de glúten adequadas, ou seja, baixa elasticidade e média extensibilidade (MAILHOT & PATTON, 1988).

As características reológicas das massas dos *crackers* dependem basicamente das proteínas, formadoras do glúten, gliadina e glutenina. Na etapa de mistura é formada a rede do glúten, através de ligações dissulfeto e de outros tipos de interações, as quais são responsáveis pelas propriedades mecânicas das massas. A presença de proteases da própria farinha ou adicionada no processamento, provoca quebra parcial na rede proteica pelo rompimento de ligações peptídicas, sendo que a extensão desta quebra irá depender do tipo e do teor de enzima adicionada à formulação. Segundo LIN et al. (1993) as enzimas proteolíticas atuam no enfraquecimento da rede do glúten diminuindo sua elasticidade e reduzindo os tempos de mistura e de fermentação das esponjas.

A adição de proteases no processamento de crackers diminui ou mesmo elimina os efeitos decorrentes do fenômeno de retração das massas, de tal forma que se pode controlar as características dimensionais dos biscoitos. Desta forma, a indústria de biscoitos que utiliza enzimas proteolíticas, passa a dispor de um mecanismo eficaz contra as consequências indesejáveis de excessivo teor proteico verificado em determinadas farinhas. Os efeitos dessas enzimas nas propriedades viscoelásticas do glúten determinam a formação de um produto mais friável, de menor densidade e dureza, e melhor textura.

As proteases também influenciam as propriedades organolépticas dos crackers promovendo a liberação de aminoácidos que, no período de fermentação e cozimento,

participam de reações responsáveis pelo escurecimento desejável dos biscoitos e desenvolvimento do aroma e sabor, o que leva à melhoria da sua palatabilidade (MONNIER & GODON, 1975; HASEBORG, 1981; LYONS, 1982).

A adição de agentes redutores, como cisteína ou bissulfito, também causam modificação na rede do glúten; porém a formação de grupos sulfidrilas livres podem resultar em compostos que prejudicam o sabor dos biscoitos (HASEBORG, 1981; LYONS, 1982).

No Brasil, a farinha de trigo é comercializada sem o conhecimento de sua qualidade tecnológica, o que torna necessário adequá-la às especificações de qualidade estabelecidas para cada produto de panificação, o que pode ser feito através de alterações no processamento e/ou o uso de aditivos.

O emprego de proteases de origem fúngica ou bacteriana apresenta-se como uma possibilidade para resolver os problemas relacionados com a qualidade da farinha de trigo para uso no processamento de crackers.

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver a formulação e as condições de um processo laboratorial para produção de biscoito tipo *cracker*, através do qual foi possível estudar os efeitos da adição de proteases comerciais, fúngica ou bacteriana, em variáveis do processamento dos *crackers*, em propriedades da massa e na qualidade do produto final.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.A qualidade da farinha de trigo

A farinha de trigo é a matéria prima básica do processamento de biscoitos e *crackers*, e certamente o ingrediente de maior variabilidade em relação aos demais. CREIGHTON & HOSENEY (1990a) admite que o maior problema encontrado na produção comercial de *cracker* é a variação na qualidade das farinhas, que embora apresentando composições químicas similares podem resultar em produtos de qualidades distintas.

A seleção de trigos de boa qualidade para produção de *crackers* é extremamente importante, uma vez que as características desejadas na farinha e no produto final devem estar presentes no trigo (TANILLI, 1976). A qualidade da farinha de trigo está, portanto, diretamente relacionada com o tipo de trigo de origem, o qual através de suas características determina a principal propriedade de uma farinha, a força, a qual reflete diretamente na qualidade tecnológica do produto final.

#### 1.1. Tipos de trigo

Os trigos pertencentes à espécie *Triticum aestivum* podem ser agrupados em cinco grandes categorias: trigos duros vermelhos de inverno, trigos duros de primavera, trigos moles vermelhos de inverno e trigos moles branco de inverno e de primavera (PYLER, 1982).

O conteúdo de proteína dos trigos depende principalmente de fatores agrônômicos e ambientais, tais como teores de nitrogênio e de umidade do solo e temperatura durante o período de desenvolvimento da planta. O conteúdo de proteína do grão pode variar entre 7 a 20%, podendo ser encontradas, ocasionalmente, amostras fora desta faixa (CAMPBELL & LEE, 1982).

As farinhas provenientes de trigos moles se diferenciam das farinhas de trigos duros pelo teor de proteína mais baixo, menor capacidade de retenção de água, menores quantidades de amido danificado, menor tolerância a mistura, granulometria mais fina e estrutura do glúten menos elástica e mais extensível (EL DASH et al., 1982).

O trigo mole possui propriedades adequadas ao processamento de biscoitos e *crackers*, com conteúdos de proteínas relativamente baixos e propriedades de glúten mais suaves (TANILLI, 1976; THOMSON, 1976).

Segundo alguns autores as farinhas recomendadas para *crackers* são produzidas a partir de trigo mole de inverno, de ambas, variedades branca e vermelha (THOMSON, 1976; ALCHELE, 1981; PYLER, 1982). Entretanto, algumas vezes podem ser usadas, em misturas, quantidades limitadas de trigos duros de baixo conteúdo protéico. O teor de proteínas dos trigos moles se encontra na faixa de 8,0 a 11,0% o que é considerado relativamente baixo, quando comparado aos valores de proteína dos trigos duros (11,0-14,0%) HALVERSON & ZELENY (1988). Farinhas com baixo teor de proteína (7,0-9,0%) obtidas a partir de trigo mole são preferidas para fabricação de bolos e biscoitos (ALCHELE, 1981; BEDNARCYK, 1987; HOSENEY et al., 1988).

## **1.2. Força da farinha de trigo**

As farinhas de trigo podem ser classificadas de acordo com a sua força, em fracas, médias ou fortes, o que está diretamente relacionada ao conteúdo e à qualidade das proteínas.

A rede proteica da farinha de trigo é essencialmente responsável pela possibilidade da farinha ser usada em produtos de panificação, devido às propriedades viscoelásticas do glúten. As proteínas são consideradas os componentes mais susceptíveis a alterações de suas características físico-químicas, as quais por sua vez, influenciam suas propriedades funcionais (KRÜGER et al., 1987; ATTENBURROW et al., 1990; NIKOLAIDIS & LABUZA, 1996).

Os demais componentes da farinha de trigo e os ingredientes adicionados à formulação, bem como as condições do processamento, também influenciam as propriedades da massa e a qualidade organoléptica do produto. Contudo, pesquisas têm mostrado que diferenças na qualidade de farinhas de trigo são devidas, essencialmente, as diferenças nos constituintes da proteína (BUSHUK, 1985).

### **1.3. Avaliação da qualidade da farinha**

Algumas características de qualidade de uma farinha podem ser determinadas por meio de equipamentos laboratoriais que avaliam as características reológicas da massa obtidas basicamente da mistura de farinha e água (VITTI et al., 1988). No entanto, para se conhecer a qualidade da farinha e a sua adequação na fabricação de um determinado produto (EL DASH, 1978; MANSOUR, 1982; MILLER & HOSENEY, 1997), a farinha de trigo deve ser também submetida a testes físico-químicos, químicos e ao teste de panificação que simula a obtenção do produto, em escala laboratorial.

Os testes reológicos podem ser feitos usando-se o farinógrafo e o extensógrafo, que medem a força da farinha e seu posterior comportamento, após os esforços mecânicos, que é submetida durante os vários estágios do seu processamento. Esses testes possibilitam conhecer a absorção de água da farinha, as propriedades de mistura e as características de elasticidade e extensibilidade da massa (OLIVER & ALLEN, 1994).

Cada farinha possui uma taxa de absorção de água específica. A absorção ótima da farinha é um ponto crítico para o desenvolvimento da massa do biscoito *cracker*. Massas com alta absorção resultam em produtos pesados e duros, sem a leveza e crocância desejadas (ROGERS & HOSENEY, 1987).

Segundo MAILHOT & PATTON (1988) as farinhas usadas na produção de *crackers* devem apresentar baixos valores de absorção de água (48 a 52%), estabilidade à mistura (1 a 3 minutos) e tempo de desenvolvimento (1 a 3 minutos), porém valores médios e baixos para os parâmetros extensibilidade e resistência à extensão. Estes

autores admitem que farinhas de trigo para *crackers* devem ter conteúdos de proteína de 9 a 10% e serem mais fortes que aquelas usadas em outros tipos de biscoitos

As farinhas fortes produzem biscoitos folheados com bom fator de expansão e maior dureza. Entretanto, por apresentarem alta elasticidade conferem aos *crackers* maior peso, quando comparados aos *crackers* obtidos de farinha de força média (ROGERS & HOSENEY, 1989a). Por outro lado, farinhas fracas produzem biscoitos com consistência suave e menor expansão no sentido vertical.

De acordo com SMITH (1972) é recomendado na produção do *cracker* o uso de farinhas de força média, contendo de 9 a 9,5% de proteína e viscosidade MacMichael de 50 a 60%. No entanto, como o processo de fabricação de *crackers* usualmente se divide em duas etapas, podem ser utilizadas farinhas dos tipos forte, na primeira etapa (esponja) e fraca na segunda (massa).

WADE (1972b) mostrou que a qualidade do *cracker* resulta de uma forte interação entre as propriedades das farinhas (principalmente o conteúdo de proteínas) e as condições de processamento. Observou que os melhores *crackers* foram produzidos a partir de farinhas com conteúdo de proteína de 10,5 a 11,5%.

## **2. O processo de produção do biscoito tipo *cracker***

Os biscoitos tipo *cream cracker* são tradicionalmente preparados através de um processo convencional, chamado esponja e massa, envolvendo um período total de fermentação de aproximadamente 24 horas (PIZZINATTO & HOSENEY, 1980a). No processamento deste tipo de biscoito, a fermentação é a fase mais importante, razão pela qual a maioria das pesquisas aí se concentram.

As dificuldades encontradas na produção de *crackers* são geralmente atribuídas às variações nas características da farinha. Entretanto, considera-se que a qualidade tecnológica do produto final depende, sobretudo, da formulação (ingredientes), do

desenvolvimento mecânico da massa e do seu comportamento nas etapas do processamento, as quais devem ser rigorosamente controladas.

## **2.1. *Ingredientes usados na formulação de crackers***

Os ingredientes normalmente usados na formulação de *crackers* consistem de farinha de trigo, água, fermento, gordura, açúcares, bicarbonato de sódio e cloreto de sódio. Podem ser usados também malte e suplemento enzimático.

A seguir serão feitas considerações sobre os teores e a função dos ingredientes usados na formulação de *crackers*, e as etapas de processamento, fatores estes que afetam a qualidade tecnológica do produto.

### **2.1.1. *Água***

A água é um constituinte importante na formulação dos *crackers*, tendo a função de dissolver os ingredientes solúveis e hidratar o glúten, promovendo o seu desenvolvimento (VITTI et al., 1988; ROGERS & HOSENEY, 1987). Seu conteúdo na massa encontra-se na faixa de 29 a 34%, em relação ao peso total da farinha. A quantidade de água é determinada pela força da farinha, sua absorção e consistência desejada da massa.

A água utilizada na produção de biscoitos, deve ser considerada potável. A presença de íons como  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$  têm efeito benéfico, entretanto, excesso de radicais básicos (hidróxido, bicarbonato) são prejudiciais às massas, pois aumentam o pH acima do nível ótimo para a fermentação.

A água tem participação importante em reações químicas e bioquímicas na massa, o que influencia suas propriedades físicas, tais como consistência, extensibilidade, pegajosidade, maleabilidade, elasticidade e umidade. A qualidade da água tem sido, em alguns casos, considerada responsável por variações na qualidade dos biscoitos *crackers* (MATZ, 1968; EL DASH et al., 1982; ROGERS & HOSENEY, 1987).

Segundo GAINES & FINNEY (1988) a quantidade de água em um biscoito é função do tamanho, número, e uniformidade de espaços vazios, densidade, fissuras e estrutura da rede proteica.

### 2.1.2. Fermento biológico

A levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) é um ingrediente básico para produção de biscoitos fermentados, tais como os *crackers*. Ela é utilizada como fonte de enzimas, melhorador de sabor e agente de crescimento (EL DASH et al., 1982; LABUDA et al., 1997), tendo como principal função o condicionamento das proteínas do glúten durante a elaboração dos biscoitos.

Pela ação do fermento na massa ocorre a produção de gás carbônico em grande quantidade, e o aumento do volume, que conferem leveza a massa. Outra ação importante da levedura durante a fermentação é a produção dos ácido lático e acético que podem refletir na qualidade do produto final (WHITELEY, 1971; SMITH, 1972; HOSENEY, 1991; LABUDA et al., 1997). São também produzidos outros componentes menores, tais como álcoois, cetonas e ácidos, que contribuem para o aroma e sabor das massas e do produto final (BOBBIO & BOBBIO, 1995; LABUDA et al., 1997). A diminuição do pH, atribuída aos ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação, pode afetar as propriedades reológicas da massa. O abaixamento do pH propicia o aumento da atividade da enzima proteolítica da farinha (PIZZINATTO & HOSENEY, 1980b; HOSENEY, 1991).

Segundo HOLMES & HOSENEY (1987) a levedura atua na massa em largas faixas de pH e mantém uma produção substancial de gás entre os pH 3,7 e 8,0, que é o intervalo encontrado na massa do *cracker* durante a fermentação. Valores de pH próximo a 5,5 foram considerados ótimos.

A levedura altera as propriedades físicas da massa, especialmente a elasticidade do glúten, por sua ação de estiramento gerada pela difusão e concentração de CO<sub>2</sub>. Esta

destruição da concatenação de fibras do glúten causa o amolecimento da massa, o que é comumente chamado de acondicionamento do glúten (SMITH, 1972)

Em estudos sobre os efeitos da fermentação na produção de “Saltine cracker”, ROGERS & HOSENEY (1989b) evidenciaram a importância da levedura na esponja do *cracker*. A densidade da massa diminuiu com o aumento da fermentação e conseqüentemente o peso do cracker diminuiu. As células da estrutura do *cracker* tornaram-se mais finas e uniformes. Os mesmos autores também mostraram que durante as 18 horas de fermentação, o gás foi produzido, o pH declinou e as proteínas da farinha foram enzimaticamente modificadas.

De acordo com HOSENEY (1991) a fermentação é necessária para modificar o glúten, desenvolver o aroma e textura característicos dos biscoitos. É portanto, responsável pelas mudanças reológicas na esponja do cracker que irão dar as características do produto final.

### **2.1.3. Gordura**

A qualidade do biscoito cracker está associada a qualidade da gordura utilizada (THE BISCUIT AND CRACKER MANUFACTURES ASSOCIATION, 1981). São normalmente gorduras usadas em estado líquido, as quais auxiliam na obtenção de uma melhor dispersão durante o curto período de tempo de mistura que é característico da massa do processo de produção de *cracker*. A gordura pode ser usada tanto na esponja como na massa (MATZ, 1968; EL DASH et al., 1982).

Segundo VITTI et al. (1988) a adição de gordura na fase esponja ou massa ainda é muito controversa. Existem três formas de adição de gordura nas massas: 30% do total sobre a esponja e o resto sobre a massa; 50% sobre a esponja e 50% sobre a massa e 70% sobre a esponja e 30% sobre a massa, sendo esta última proporção usada quando se deseja retardar o processo de fermentação. HAMED-FARIDI (1980) acrescenta que a gordura contribui para leveza e friabilidade dos crackers e também para

a melhora da expansão e do sabor. O mesmo autor recomenda níveis altos de gordura nas massas para ajudar a controlar a quebra dos crackers, um dos maiores problemas na produção do *cracker*. EL DASH (1982) e VITTI (1988) ressaltam o efeito benéfico do uso de gorduras nas massas, afirmando que funciona como amaciador de glúten, contribui para o aroma e sabor, melhora a expansão e lubrifica a massa dos biscoitos.

É recomendado o uso das gorduras líquidas e óleos em massas de crackers para obtenção de uma melhor textura e intensificação do sabor no cozimento (MATZ, 1968; ALCHELLE, 1981).

#### **2.1.4. Sal (Cloreto de sódio)**

O sal tem propriedades adstringentes, atuando como fixador da água no glúten. Além de influenciar no sabor e aroma, é também usado como agente de controle da fermentação (WHITELEY, 1971; NIMAN, 1996). Caso o sal não seja adicionado à massa, a fermentação ocorrerá rapidamente; no entanto se o conteúdo de sal exceder 2% sobre o peso da farinha, a fermentação será retardada excessivamente (WHITELEY, 1971).

O sal também age como inibidor das enzimas proteolíticas que atuam sobre o glúten, portanto o seu uso em excesso, é prejudicial (MATZ, 1968; NIMAN, 1996).

O sal tem efeito no fortalecimento da esponja do *cracker* pelo aumento da resistência à extensão, enquanto que o bicarbonato de sódio parece aumentar a extensibilidade da massa do *cracker* (PIZZINATTO & HOSENEY, 1980b).

A quantidade de sal adicionado às massas é relativamente pequeno, entretanto proporciona um sabor moderadamente salgado, quando usado devidamente, ressaltando o sabor e o aroma de cada ingrediente da formulação (SMITH, 1972; NIMAN, 1996).

Em resumo, os efeitos principais do sal nas massas dos biscoitos *crackers* são refletidos principalmente na diminuição da absorção de água, no fortalecimento do

glúten, auxiliando na retenção de gás, além de contribuir para uma melhor textura, sabor e volume do produto (EL DASH et al., 1982).

#### **2.1.5. Bicarbonato de sódio**

Durante a fermentação da esponja ocorre a formação de ácidos pela ação de certos microrganismos presentes na farinha. A quantidade de tais microrganismos é variável, não podendo se prever com precisão a quantidade de ácidos formados. O ácido produzido na massa deve ser neutralizado pela adição de bicarbonato de sódio para garantir a qualidade do produto final. Por isso, o bicarbonato de sódio deve ser adicionada no estágio de preparação da massa e a quantidade a ser utilizada deve ser calculada para neutralizar a acidez gerada na fermentação (RENZO, 1975; LAJOIE & THOMAS, 1994).

O bicarbonato de sódio neutraliza os ácidos formados na fermentação, definindo o pH e a cor do produto final. Os *crackers* podem apresentar diferentes valores de pH, porém em geral, os valores se encontram ao redor de 7,0 o que é considerado ótimo para obtenção de melhores características de sabor (PIZZINATTO, 1979; LAJOIE & THOMAS, 1994).

#### **2.1.6. Outros ingredientes**

Agentes químicos, como bissulfito de sódio, cisteína e glutatona, são efetivos na redução da resistência à extensão da esponja do *cracker*, em valores altos de pH. Entretanto, este efeito é eliminado pela produção de ácido láctico durante a fermentação da esponja. Portanto, no processo de fermentação, o valor do pH da esponja é determinante, devendo ser considerado na escolha de agentes redutores ou proteases (WU & HOSENEY, 1990).

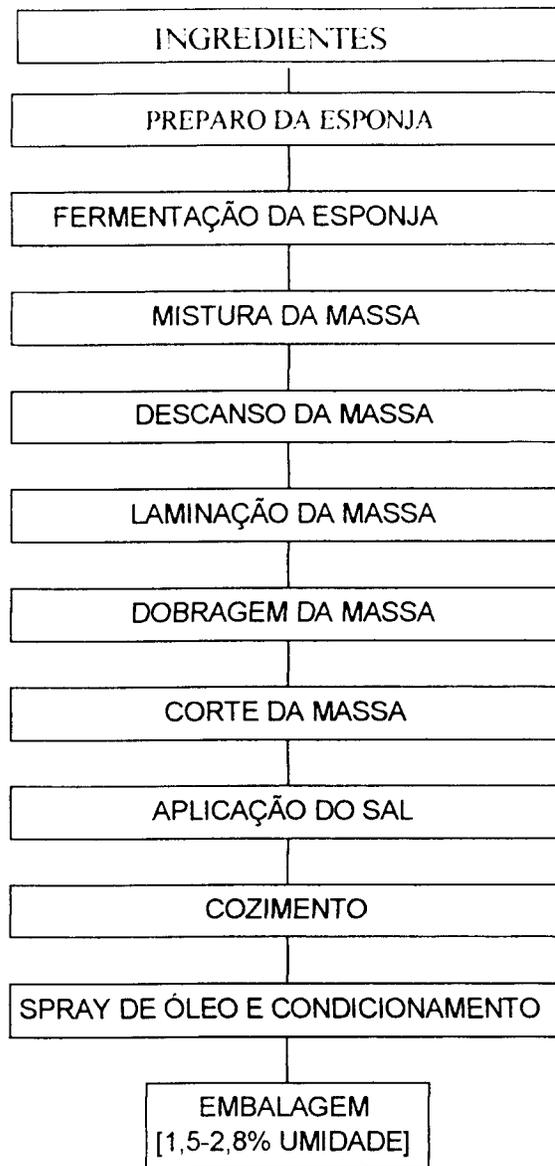
Os cereais maltados são utilizados no processamento de biscoitos como fonte de enzimas para produção de açúcar, a partir da hidrólise do amido, o qual pode ser

usado pelo fermento e/ou participar na reação de Maillard no cozimento da massa no forno (WOLFMAYER & HELLMAN, 1960; WITHELEY, 1971; SI, 1997)

A adição de malte à massa acelera a fermentação e repõe o açúcar consumido pelas leveduras durante o prolongado período de fermentação da esponja. Entretanto, foi demonstrado que a atividade diastática não é favorecida pela condição alcalina da massa. O objetivo da adição de malte diastático na esponja é ajustar a atividade enzimática na farinha (MATZ, 1968; WITHELEY, 1971, SMITH, 1972).

## 2.2. *Fluxograma*

Os biscoitos fermentados incluem os tipos *cream cracker*, *saltine cracker*, água e sal e os chamados *snack crackers*. Geralmente é utilizado fermento biológico nestes produtos, sendo o tempo de fermentação variável em função do produto final. No entanto, as características das matérias-primas, assim como do processo de produção dos *crackers*, se assemelham, envolvendo longos períodos de fermentação (VITTI et al., 1988; HOSENEY et al., 1988), necessários para se obter as mudanças responsáveis pela textura própria e outros atributos de qualidade dos *crackers*. Após a etapa da fermentação, a massa é introduzida em uma moega alimentadora, iniciando-se o processo de laminação, estampagem, cozimento, resfriamento e empacotamento. Na Figura 1 é apresentado o fluxograma da produção de *saltine cracker* pelo processo de esponja e massa.



**Figura 1 – Fluxograma da produção de Saltine cracker pelo processo esponja e massa.**

Fonte: HOSENEY et al. (1988)

### 2.3. *Etapas do processo*

No processamento de biscoitos tipo *crackers*, os ingredientes tais como farinha, água, fermento, gordura, malte, bicarbonato de sódio e sal são misturados em dois estágios. No preparo da esponja a mistura é feita em misturadores especiais e deve ocorrer em tempo suficientemente curto para homogeneização dos ingredientes. O longo período de fermentação da esponja influencia as fases seguintes do processo, definindo a qualidade do produto final. O preparo da massa é feito com a adição dos ingredientes remanescentes, devendo-se misturar por 3 a 6 minutos para distribuir a gordura e o bicarbonato, e fermentando-se em seguida (VITTI et al., 1988). Na laminação dos *crackers*, a massa passa através de pares de rolos laminadores, onde sofre redução de forma gradual e uniforme, sendo, em seguida, cortada através de rolos estampadores.

O cozimento dos *crackers* é feito em fornos contínuos divididos em zonas de aquecimento, com controles independentes de temperatura, o que possibilita ajustes, de acordo com cada produto (ALCHELE, 1981). A escolha adequada da temperatura do forno e do tempo de cozimento deve ser feita considerando-se as condições do processo utilizado na indústria.

#### 2.3.1. **Fase esponja: mistura e fermentação**

Convencionalmente a mistura é feita em duas etapas conhecidas como fase esponja e fase massa. A esponja é preparada a partir da mistura de 60 a 70% da farinha de trigo, água e o fermento e, em alguns casos, parte da gordura (HAMED-FARIDI, 1980). Os ingredientes da esponja devem ser misturados por tempo suficiente para permitir a distribuição da água e do fermento na farinha, já que o excesso de mistura prejudica o processo fermentativo, acelerando-o e acarretando problemas nas fases posteriores. São recomendados tempos de mistura de 1 a 3 minutos, em misturador horizontal ou vertical, em rotação de 30 a 50 rpm (THE BISCUIT AND CRACKER MANUFACTURES ASSOCIATION, 1981).

PIZZINATTO & HOSENEY (1980a) consideraram o tempo ótimo de mistura total do processo em cerca de 8 minutos (3 minutos para esponja e 5 minutos para massa) e esclarecem que um tempo excessivo é prejudicial a massa. Esses mesmos tempos de mistura também são propostos por FARIDI & JOHNSON (1978).

As proteínas absorvem água e incham (efeito do tempo/temperatura) até o ponto onde a ação da mistura possibilita a conversão da proteína hidratada em uma rede tridimensional que confere a massa suas propriedades reológicas características (WADE, 1988).

ROGERS & HOSENEY (1987) em seus estudos sobre os testes para determinar a ótima absorção de água para massa de “Saltine cracker” afirmaram que em geral a indústria de processamento do *cracker*, a taxa ótima de absorção de água da massa é determinada por uma série de testes com esponjas variando-se o nível de água entre 22 e 30%, baseado no peso total da farinha. Esta técnica requer um grande número de esponjas e um longo tempo para definição, da taxa ótima de absorção da água de cada farinha, considerada um ponto crítico para o desenvolvimento adequado da massa do *cracker*.

A fermentação da esponja do *cracker* é similar à usada na produção das massas de pão, pelo método indireto, com preparação de uma esponja. A esponja, fermentada serve como inóculo de microrganismos para iniciar a fermentação da massa (SUGIHARA, 1978). A etapa da fermentação da esponja é considerada importante para se obter produtos de qualidade, porém é muito demorada (cerca de 18 horas) representando 75% do tempo total de produção do *cracker* (PIZZINATTO & HOSENEY, 1980a).

No processo convencional dos *crackers*, uma grande parte das transformações reológicas da massa ocorrem durante as 18 horas de fermentação da esponja, causadas pela quebra de ligações dissulfeto das proteínas responsáveis por mudanças no glúten (WU & HOSENEY, 1990a). As modificações físicas e químicas que ocorrem,

principalmente na fase esponja, são responsáveis pela determinação das propriedades de manuseio da massa, pelo sabor típico e em parte pela textura final que caracterizam os *crackers* (FIELDS et al., 1982; DOESCHER & HOSENEY, 1985a, HOSENEY et al., 1988)

As esponjas são fermentadas em ambiente a temperatura entre 28 e 30°C, e umidade relativa na faixa de 80-90% (PIZZINATTO & HOSENEY, 1980a).

Dentre as inúmeras mudanças importantes, ocorre o aumento na acidez da esponja. Os ácidos formados são resultantes da atividade da levedura e de outros microrganismos, incluindo bactérias, as quais estão presentes na esponja. Estes efeitos são mostrados nos estudos realizados por SANG et al. (1997).

WU & HOSENEY (1989) observaram que à medida que o tempo de fermentação da esponja aumenta, o pH diminui até valores próximos a 4,1, considerado ótimo para a atividade de enzimas proteolíticas nativas da farinha, que participam de mudanças reológicas na esponja do *cracker*.

Os ácidos láctico e acético são os principais ácidos na fermentação da esponja do *cracker* (THE BISCUIT AND CRACKER MANUFACTURES ASSOCIATION, 1981). O ácido láctico constitui cerca de 80% do material ácido da esponja fermentada, o qual é provavelmente produzido a partir de açúcares resultantes da atividade diastática das enzimas presentes na esponja. O ácido acético constitui a maior porção dos 20% dos ácidos remanescentes da esponja. A quantidade de ácido carbônico formada não é significativa.

### **2.3.2. Fase massa: mistura e fermentação**

O segundo estágio do processamento de *crackers*, que consiste no preparo da massa, é importante pois dele depende a qualidade do produto final. O excessivo tempo de mistura reduz a expansão vertical do biscoito, produzindo textura dura e pouco

estratificada. Já um tempo curto dificulta a laminação, porém produz biscoitos mais tenros. MATZ (1968) também admite que o tempo de mistura influi na laminação. A massa é preparada misturando-se por 3 a 7 minutos, o remanescente da farinha e os outros ingredientes com a esponja fermentada.

O período de fermentação da massa é normalmente de cerca de 6 horas. Como as bactérias não são ativas devido ao baixo pH, é de se esperar que a fermentação por leveduras seja predominante (HOSENEY, 1991).

ROGERS & HOSENEY (1989b) assumiram que o estágio de fermentação da massa é simplesmente um período de hidratação, permitindo que os 30 a 40% da farinha adicional se equilibre com a umidade dos ingredientes da esponja. O volume da massa aumenta com o aumento do tempo de descanso até aproximadamente 4 horas e depois diminui. Nas primeiras duas horas de descanso, o peso médio da massa é maior que nos outros períodos.

Maiores períodos de descanso propiciam melhor elasticidade e condições de laminação da massa, produzindo *crackers* mais resistentes e de maior leveza. No entanto, se o tempo de hidratação for muito longo a massa tende a ficar seca (DOESCHER & HOSENEY, 1985a).

### **2.3.3. Laminação e corte**

As passagens da massa através de equipamentos de laminação e corte têm maior efeito nas características do produto final que qualquer outra operação do processo (WADE, 1972c). A textura e a qualidade de mastigação são parcialmente controladas pelas condições dessas duas operações, cujos equipamentos variam amplamente, em diferentes indústrias, e quando limitados, dificultam ou impossibilitam obter resultados satisfatórios (THE BISCUIT AND CRACKER MANUFACTURES ASSOCIATION, 1981).

Segundo WADE (1972c) as dificuldades encontradas no processamento dos *crackers* estão principalmente associados à operação de laminação, que está diretamente relacionada com as complexas propriedades viscoelásticas das massas, que resultam em variações marcantes em algumas características físicas do biscoito tipo *cracker*. De acordo com MATZ (1968) as mudanças que ocorrem na massa durante a laminação refletem no produto final, e estão também relacionadas com a interação da massa com o equipamento, a qual é importante para o controle das características dimensionais do produto.

Para formar adequadamente uma lâmina de massa é necessário seguir criteriosamente a operação de laminação. A formação da lâmina uniforme é extremamente importante, de interesse econômico e deve ser controlada na linha de produção (WHITELEY, 1971).

De acordo com EL-DASH et al., (1982) a massa é laminada inicialmente por rolos estriados e reduzida gradativamente de 35 até 4 a 5mm de espessura. Esta lâmina é dobrada em 6 a 8 camadas de massa, as quais são reduzidas por um conjunto de rolos redutores finais. Após a superposição de camadas pode ser adicionada, entre as lâminas, uma espécie de farofa constituída de farinha, gordura e sal, na proporção de 100:40:1, respectivamente, os quais devem ser homogeneizados e peneirados antes da adição.

Após a passagem pelos rolos redutores finais, a lâmina obtida é cortada por prensa estampadora. O corte da lâmina deve ser eficiente para selar as margens externas dos biscoitos e cortar nitidamente a massa (EL-DASH et al., 1982).

#### **2.3.4. Cozimento**

Muitas modificações acontecem na massa dos biscoitos no processo de cozimento. Entre as modificações mais importantes podem ser citadas a perda de umidade, desenvolvimento da cor, sabor, aroma e mudanças nas dimensões.

O conteúdo de umidade final controla a estabilidade dos *crackers* durante a estocagem e a sua integridade mecânica (tendência a quebra), além do desenvolvimento de sabores (WADE, 1988).

A cor da crosta constitui um bom indicativo do teor de açúcar caramelizado na superfície do biscoito. A reação de Maillard, entre os açúcares redutores e aminoácidos está também envolvida no cozimento. Os produtos destas reações são compostos voláteis que contribuem para o aroma e sabor de biscoitos cozidos (EL-DASH & JOHNSON, 1967; WADE, 1988).

O cozimento do biscoito *cracker* pode ser feito em fornos de aquecimento indireto, de turbulência ou dielétricos, por tempos que variam de 2,5 a 3,5 minutos, dependendo do tipo de forno. Recomenda-se que na primeira zona a temperatura da base seja mais alta para propiciar um crescimento rápido do biscoito (VITTI et al., 1988). De acordo com EL DASH et al. (1982) o cozimento dos biscoitos *crackers* apresenta variações de temperatura nas diferentes zonas. Um forno de 60 metros requer 3 minutos de cozimento, com temperaturas nas zonas usualmente distribuídas da seguinte forma:

1ª zona Base=260°C	3ª zona Base=260°C
Teto=168°C	Teto=293°C
2ª zona Base=316°C	4ª zona Base=260°C
Teto=255°C	Teto=255°C

### **2.3.5. Resfriamento e empacotamento**

No final do cozimento no forno os biscoitos têm valores de umidade situadas entre 5 a 8%, as quais decrescem até 3,5 a 4% após a retirada do forno e resfriamento. O tempo de resfriamento deve ser de cerca de 20 minutos segundo WADE (1972a), até reduzir a temperatura a níveis baixos para não provocar problemas no empacotamento.

Os biscoitos saem do forno ainda muito quentes, moles e com umidade não uniformemente distribuída e precisam, portanto, de resfriamento adequado antes de serem embalados.

Durante o resfriamento pode ocorrer alguma troca de umidade entre o produto e a atmosfera que o envolve, dependendo da umidade relativa do ar. Entretanto, a mais importante mudança nesta etapa é a redistribuição de umidade dentro do produto (WADE, 1988).

Além da perda de umidade e diminuição de temperatura, ocorrem durante o resfriamento, a mudança de estado dos principais componentes, os quais afetam as dimensões dos biscoitos. Ocasionalmente acontecem alterações na espessura dos biscoitos. Estas mudanças podem acarretar problemas de trincas ou quebras (EL-DASH et al., 1982).

### 3. Enzimas proteolíticas

As enzimas são compostos protéicos que atuam em variados substratos transformando-os em compostos menores tendo em vista a utilização destes compostos. Desde que o metabolismo é muito complexo, há milhares de diferentes espécies de enzimas. As enzimas têm sido divididas pela "Comissão Internacional de Bioquímica" em seis grandes classes:

<b>Classe</b>	<b>Tipo de reação catalisada</b>
Oxirredutases	Transferências de elétrons
Transferases	Reações de transferência de grupos
Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para água)
Liasas	Adição de grupos a duplas ligações ou o inverso
Isomerases	Transferência de grupos dentro de moléculas produzindo formas isoméricas.
Ligases	Formação de ligações C - C, C - S, C - O e C - N por reações de condensação acopladas à clivagem de ATP.

As proteases são enzimas que se distribuem amplamente nos seres vivos, sendo encontradas em animais, microrganismos e vegetais. As enzimas proteolíticas, proteases ou proteinases, pertencem a classe das hidrolases e quebram moléculas pela introdução de água (BARRET, 1975).

As enzimas proteolíticas hidrolisam as ligações peptídicas das proteínas com formação de grupos amina ( $\text{NH}_2$ ) e carboxila ( $\text{COOH}$ ), originando polipeptídeos de menor peso molecular e aminoácidos simples (SPRÖBLER, 1981; HASERBORG, 1984; KRÜGER & REED, 1988).

As proteases em geral não podem hidrolizar moléculas de proteínas ao acaso, mas apenas quebram ligações peptídicas bem definidas, entre certos aminoácidos. Entretanto, algumas proteases não são específicas e podem quebrar ligações peptídicas das proteínas resultando em moléculas menores (SPRÖBLER, 1981).

As proteases fúngica ou bacteriana, são normalmente usadas nas massas do *cracker*. As enzimas enfraquecem o glúten durante a fermentação promovendo um balanço adequado entre extensibilidade e força da massa (BARRET, 1975).

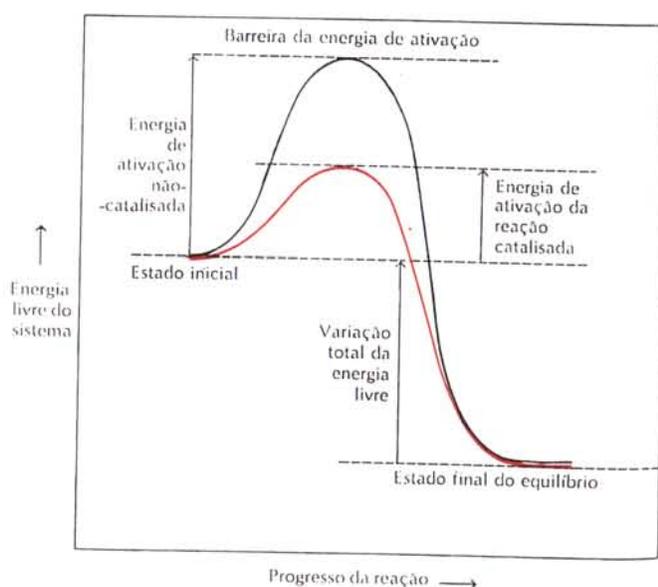
O efeito das enzimas proteolíticas na massa assemelha-se, de certo modo, com o efeito dos agentes redutores. A principal diferença é que a ação das enzimas não pode ser revertida por agentes oxidantes, pois elas não alteram a concentração dos grupos SH e SS no glúten limitando-se a formar pequenas cadeias de polipeptídeos (PYLER, 1982).

### **3.1. Atividade enzimática**

A atividade de uma enzima ou atividade enzimática é um método para avaliar a capacidade que tem uma enzima de transformar um substrato. Pode-se considerar que a atividade reflete a velocidade de uma reação enzimática e, portanto, quanto maior a atividade maior a velocidade e, por conseguinte, maior a concentração da enzima no sistema.

Uma reação química clássica,  $A+B \rightarrow C$ , para que aconteça é necessário uma quantidade de energia que deve ser adicionada ao sistema. Essa energia é elevada e não seria compatível com as condições do meio no qual devem se desenvolver as reações do metabolismo dos organismos vivos. Assim essas reações no interior das células necessitam de catalizadores bioquímicos, as enzimas, cuja ação consiste em abaixar a energia de ativação o que faz acelerar a reação (MATHEWS & VAN HOLDE, 1990).

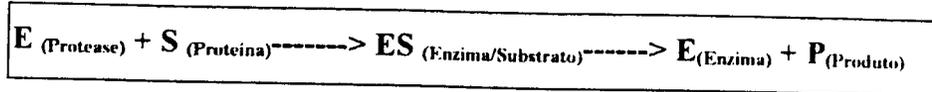
A Figura 2 mostra uma reação não catalizada e outra catalizada por enzima. Na segunda, observa-se que a energia para promover a reação é muito mais baixa que na primeira (LENHINGER, 1985).



**Figura 2 – Diagrama de energia mostrando a redução de energia livre de ativação para uma reação catalizada**

Fonte:LENHINGER (1985)

Desta forma a equação clássica que representa uma reação enzimática é dada por  $E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$ , significando que a enzima E forma com o substrato S um complexo intermediário transitório ES, resultante de uma complementação de estrutura entre o sítio ativo da enzima e a molécula do substrato. Seguindo-se, o produto vai-se formando e a velocidade diminuindo com o tempo de reação em função do decréscimo do substrato ao longo do desenvolvimento da reação. Similarmente poderíamos escrever a equação enzimática envolvendo uma protease do seguinte modo:



O produto formado está, portanto, na dependência da natureza do substrato e da protease utilizada, como o substrato é originário de uma molécula de proteína, o produto será um polipeptídeo, peptídeo e/ou aminoácido (MATHEWS & VAN HOLDE, 1990).

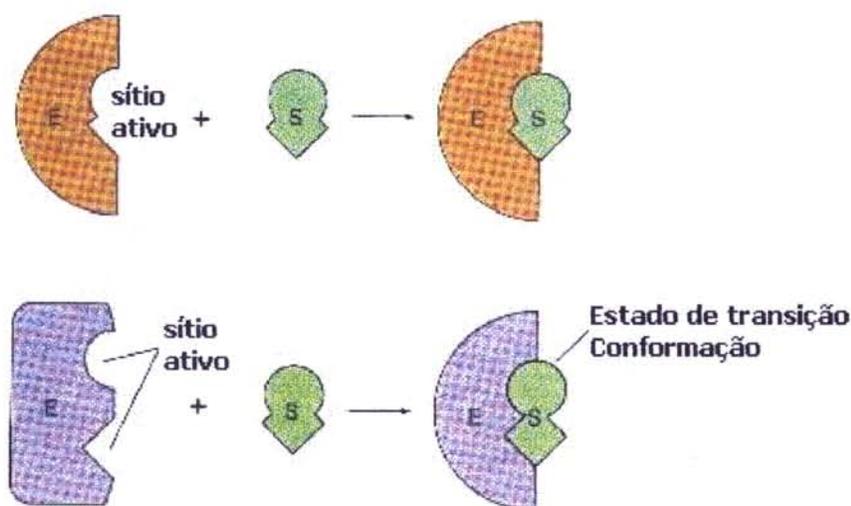
Cada enzima ou grupo tem um pH ótimo e o deslocamento do pH deste ponto inibe a atividade da enzima podendo mesma desativá-la. As proteases atuam em diferentes pHs, assim a pepsina têm uma atividade máxima no intervalo de pH 1,5 a 2,5; protease e pancreatina tem o pH ótimo em 7,5; as carboxipeptidases ácidas do trigo, apresentam um ótimo pH de 5,5 quando o substrato é um peptídeo, enquanto a papaína tem uma atividade máxima entre 5 e 7 de pH (RICHARDSON & HYSLOP, 1985).

A medida da atividade enzimática geralmente enquadra-se em três categorias, dependendo dos objetivos do experimento: 1-determinação da quantidade de uma enzima particular presente numa mistura impura; 2-determinação da quantidade de atividade remanescente em uma amostra de enzima, relativamente após, um tratamento físico ou químico (processo de purificação); 3-determinação da atividade relativa a vários substratos para definir a especificidade de uma enzima.

(amarelo)], na faixa de comprimento da onda de 360-740nm, cuja representação esquemática encontra-se na Figura 7.

A atividade de uma enzima e, conseqüentemente, de uma protease é afetada por vários fatores cujos principais e mais conhecidos são o pH, concentração da enzima, concentração do substrato e temperatura.(STEWART, 1984).

A concentração da enzima e substrato regulam a atividade enzimática de modo que em condições ótimas de reação (pH, temperatura, etc) a velocidade da reação aumenta com a concentração da enzima, mantendo-se saturada à concentração do substrato. A interação enzima/substrato em condições normais, faz-se através dos sítio(s) ativo(s) da enzima que recebe a molécula do substrato conforme a Figura 3 (MATHEWS & VAN HOLDE, 1990).



**Figura 3 - Modelos de interação entre a enzima e substrato**

Fonte: MATHEWS & VAN HOLDE (1990)

Semelhantemente ao pH existe uma zona de temperatura na qual a atividade enzimática é máxima. A variação da atividade enzimática frente à temperatura é explicada pelo aumento da frequência de colisões entre as moléculas de enzima e substrato refletindo-se no aumento da atividade enzimática. Por outro lado, a elevação da temperatura acima da zona ótima, pode causar a desnaturação da enzima modificando sua estrutura quaternária e terciária, tornando-a inativa. Em geral a temperatura de desnaturação está próxima à temperatura ótima de reação, de modo que a maioria das

enzimas mostra uma curva da velocidade de reação versus temperatura (LENINGHER, 1985).

A atividade de uma enzima sendo representada por valores numéricos necessita de uma unidade que possa expressar essa atividade e, assim, permitir a comparação da atividade entre enzima igual, de fontes diferentes, durante a extração e purificação de enzima e no estabelecimento de condições ótimas de reação. Uma unidade de atividade enzimática é definida como aquela quantidade de enzima que cataliza a hidrólise de 1 micromol de substrato por minuto em condições ótimas (padrões) de reação. Observa-se que esta definição genérica pode ser adaptada a reações específicas sem prejuízo do seu conteúdo. Por exemplo, a papaina comercializada tem no seu rótulo que uma unidade de atividade corresponde a hidrólise de 1,0 micromol de BAEE\* (benzoil - L - arginina etil-éster) por minuto a pH 6,2 e temperatura de 25°C. Por outro lado, a pepsina fabricada pela mesma indústria química expressa no rótulo que uma unidade produzirá uma variação de 0,001 de absorbância a 280nm em pH 2,0 a 37°C, medida no produto solúvel em TCA e usando hemoglobina como substrato.

Os ensaios para determinar a atividade de protease geralmente são aqueles que usam como substrato a caseína ou a hemoglobina.

O princípio dos métodos baseia-se nos produtos formados durante a reação enzimática e que são solúveis em TCA, cuja concentração é determinada através da absorbância medida a 280nm. Vários produtos oriundos de hidrólise proteica apresentam na sua estrutura química o núcleo aromático (tirosina, fenilalanina) o qual absorve luz ultravioleta (280nm). Uma unidade de atividade, nestas circunstâncias, é definida como a quantidade de uma enzima que dá uma absorbância equivalente a 1 micrograma de tirosina por minuto em condições padrões. Pode-se também medir a quantidade do produto (tirosina) solúvel em TCA através do método espectrofotométrico de Lowry.

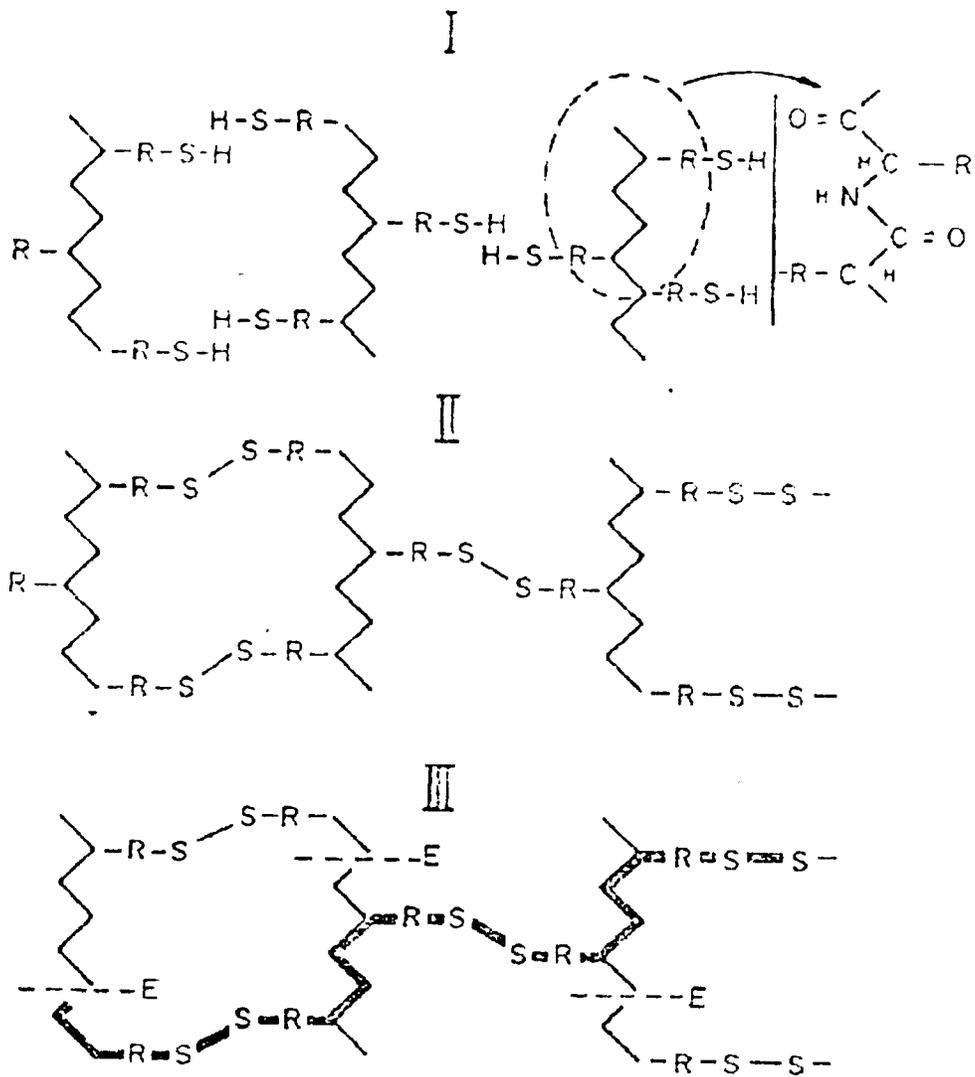
Em ambos os casos é necessário construir uma curva padrão de tirosina a fim de possibilitar a determinação de atividade de protease. A partir dos valores de atividade,

calcula-se a atividade específica que é o valor da atividade por mg de proteína. A atividade específica é a unidade que melhor permite avaliar o comportamento de uma enzima face a um tratamento de purificação, e sua variação em relação aos estágios fisiológicos de um organismo ou ainda em relação aos agentes ativadores ou inibidores.

### 3.2. *Mecanismo de ação das proteases*

Através do mecanismo de reação pode-se diferenciar basicamente dois tipos de proteases, as endopeptidases e as exopeptidases. As endopeptidases quebram as ligações peptídicas internas em uma proteína, resultando em cadeias menores. Estas proteases são eficientes nas proteínas da farinha de trigo provocando modificações nas propriedades viscoelásticas do glúten. As exopeptidases hidrolisam o final das cadeias de peptídeos, alterando, com pouca eficiência, as características reológicas das proteínas, devido as pequenas mudanças no comprimento da cadeia. Entretanto, a sua ação hidrolítica provoca a liberação de aminoácidos livres, propiciando melhora do sabor e da coloração do produto final, através da reação de Maillard durante o cozimento. (EL-DASH & JOHNSON, 1967; SPRÖßLER, 1981; HASEBORG, 1981).

A Figura 4 resume o mecanismo de ação das proteases evidenciando os efeitos da redução, da oxidação e da proteólise no desenvolvimento da rede do glúten da massa.



**Figura 4 - Efeito da redução (I), da oxidação (II) e da proteólise (III) no desenvolvimento da rede do glúten na massa.**

Fonte: Pylar (1982)

O efeito da redução (I) é apresentado pela ação dos agentes redutores no glúten, ocorrendo a quebra de ligações S-S responsáveis pela força da rede do glúten e formação de grupos SH, (sem efeito ligante), que tornam a massa extensível. Ao contrário, pela ação de oxidantes (II) grupos SH são oxidados com formação de ligações S-S entre as cadeias, que tornam a massa elástica. O mecanismo de ação das enzimas proteolíticas (III) mostra a hidrólise de proteínas, criando no sistema linhas protéicas transversais e diagonais unidas por ligações S-S. Desta maneira, ocorre uma nova orientação das cadeias por meio da formação de ligações frágeis que podem ser facilmente rompidas.

O efeito das proteases na massa não pode ser determinado pelos métodos de análises bioquímicas normais. Para ser medida a ação proteolítica na massa são necessários, portanto, métodos reológicos para avaliação da modificação nas propriedades (consistência) da massa causadas pelo enfraquecimento da rede do glúten (SPRÖBLER, 1981; BRUNO, 1995).

### **3.3. Fontes**

As proteases importantes para a indústria de panificação provêm da farinha de trigo, leveduras, cereais maltados, vegetais e preparações enzimáticas obtidas a partir de culturas fúngicas ou bacterianas (PETIT & AUDIDIER, 1967; MONIER & GORDON, 1975).

Segundo PYLER (1982) os cereais, como trigo e cevada, contém níveis muito baixos de proteases, mesmo após a germinação, quando o conteúdo de amilases aumenta consideravelmente. Conforme alguns autores (PETIT & AUDIDIER, 1967; SPRÖBLER, 1981) o trigo não germinado contém níveis muito baixos de proteases no endosperma, possuindo maiores quantidades no gérmen e principalmente na camada de aleurona, porém são separados durante o processo de moagem. Isto significa que quanto menor o teor de cinzas menor atividade proteolítica da farinha.

As farinhas de malte foram utilizadas por muito tempo como fonte de proteases exógenas, entretanto, o seu uso implica na adição de amilases presentes nas farinhas maltadas juntamente com as proteases. Essas amilases, na maioria das vezes, não são desejadas no processamento, nas proporções que se apresentam nas farinhas de malte (GUILBOLT, 1972; MONIER & GODON, 1975).

Dentre as proteases exógenas à farinha, considera-se também as das leveduras, quando estas têm suas células rompidas (MONIER & GORDON, 1975; SPRÖBLER, 1981).

A grande maioria das proteases vegetais comerciais tais como papaina, bromelina e ficina são facilmente extraídas, porém a sua produção depende da disponibilidade das matérias primas de origem (LÖFFER, 1986).

Nem todas as proteases têm efeito equivalente na produção de produtos de panificação, e portanto o teor de proteases deve ser cuidadosamente controlado. Proteases fúngicas comumente usadas exibem melhor tolerância. O modo de ação da bromelina e papaina é diferente, podendo causar um maior grau de hidrólise na proteína do glúten (EL-DASH & JOHNSON, 1967).

Sabe-se que as proteases podem ser extraídas de plantas e glândulas animais. No entanto, hoje elas já são produzidas em grande número e com diferentes características através da cultura de microrganismos (bactérias e fungos) em grandes tanques (SPRÖBLER, 1981).

De acordo com BRUNO (1995) os microrganismos se apresentam como as fontes ideais de enzimas proteolíticas, sob o ponto de vista técnico e econômico. As enzimas, de origem microbiana podem ser obtidas com custos baixos e em grande escala, sob condições ambientais rigidamente controladas, de forma que se possa obter uniformidade na pureza, estabilidade e atividade dos preparados enzimáticos.

Segundo LOFFER (1986) as proteases oriundas da bactéria *Bacillus subtilis* e do fungo *Aspergillus oryzae* são consideradas GRAS (Generally Recognized As Safe) pelo FDA (Food and Drug Administration)

As proteases microbianas são as mais comuns no mercado. Para a produção de biscoitos *cracker* podem ser utilizadas as proteases fúngica ou bacteriana produzidas, respectivamente, pelo *Aspergillus oryzae* e pelo *Bacillus subtilis* (BARRET, 1975). O uso dessas proteases é permitido pela Legislação Brasileira de Alimentos de acordo com a Resolução nº 24/76 do CNNPA (ABIA, 1988).

#### **4. Uso de proteases na indústria de panificação**

A indústria de panificação utiliza proteases de origem fúngica, bacteriana ou de origem vegetal. As proteases mais adequadas ao processo de fabricação de biscoitos são as de origem bacteriana e vegetal, pela alta eficiência na degradação da rede proteica.

As proteases fúngicas são geralmente usadas devido a sua relativa termoestabilidade, seu baixo conteúdo de amilase e sua grande tolerância a super dosagem. Ao contrário, pequenas dosagens de protease bacteriana e papaina causam forte redução na resistência à extensão (elasticidade) da massa. Entretanto essas enzimas são usadas, com grande sucesso, em todas as situações onde o glúten deve ser fortemente degradado (DUCROO, 1974; SPRÖBLER, 1981).

As condições da utilização das proteases são determinadas pelo tipo de farinha que se emprega e pelos tipos e características desejadas no produto final. Na produção de pães, a partir de farinhas fortes, massas com alta elasticidade e pouca maleabilidade, podem ser melhoradas com uma proteólise branda. Por outro lado, na produção de biscoitos e *crackers*, a rede de proteína 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 desejada na produção de pães (MONNIER & GODON, 1975).

JUNGSCHAFFER (1993) com base em estudos sobre a utilização das preparações enzimáticas na indústria de alimentos, fez referências aos efeitos das enzimas na massa, indicando o uso dessas enzimas para estabilização da massa do *cracker* visando a obtenção de uma estável vida de prateleira do *cracker*.

#### **4.1. Efeito nas proteínas do glúten**

Estudos sobre as proteases naturais do trigo revelaram que a atividade proteolítica no endosperma é muita baixa, sendo mínima sua atuação nas modificações das proteínas do glúten e nas propriedades reológicas das massas (exceto no caso de uso de farinha de trigo germinado). Entretanto sua atividade contribui, através da reação de Maillard, na formação da cor e de alguns componentes específicos do aroma (LÁSZTITY, 1984).

Os efeitos das proteases no glúten durante a fermentação da esponja e massa dos *crackers* podem ser avaliados pelas modificações da força (elasticidade) do glúten e por testes que determinam as mudanças na viscosidade e solubilidade das proteínas na massa.

##### **4.1.1. Modificações na força (elasticidade e extensibilidade) e consistência da massa**

PIZZINATTO & HOSENEY (1980b) e HOSENEY (1991) afirmaram que a força da esponja do cracker diminui com o aumento do tempo de fermentação e diminuição do pH da massa. Estes efeitos têm sido atribuídos à enzima proteolítica presente na própria farinha de trigo, a qual tem atividade ótima na faixa de pH de 3,8 a 4,1. DOESHER & HOSENEY (1985b) e SHIIBA et al. (1990), mostraram que as maiores mudanças reológicas durante a fermentação acontecem em valores de pH razoavelmente altos (por volta de 5,2), ou seja, nas primeiras cinco horas de fermentação, quando a elasticidade do glúten e a força da farinha sofrem a maior queda.

A adição de proteases é benéfica no processamento de *crackers* onde é desejável uma massa maleável e extensível para controlar a textura e o volume do produto (FOX & MULVHILL, 1982; SCHMITT, 1994). Entretanto o excesso de atividade proteolítica causa um amolecimento na massa que resulta em baixa qualidade do produto final (BLOSKSMA & BUSHUK, 1988). As proteases são adicionadas durante o estágio de fermentação da esponja do *cracker* para permitir sua atuação nas proteínas da farinha (glúten) por um período de tempo prolongado. As proteases hidrolisam e encurtam cadeias de proteínas, o que possibilita realinhá-las em filmes que dão as massas um balanço adequado entre extensibilidade e elasticidade das massas. Isto permite que a etapa de laminação do processamento do *cracker* seja realizada sem rompimento das massas, resultando em um cozimento adequado do biscoito, formação de superfície lisa e ausência de bolhas ou deformações (BARRET, 1975).

Do mesma forma, GAMS (1976) esclarece que massas de *crackers* produzidas com farinhas fortes são frequentemente elásticas e curtas, tendendo a retornar à sua forma original quando esticadas. Os biscoitos apresentam problemas de laminação, tornando-se duros, pesados e com bolhas na superfície, após o cozimento. O mesmo autor justifica que o tratamento da massa com proteases permite reduzir ou remover os efeitos negativos causados pela retração da massa na laminação, um fenômeno intimamente relacionado com o excesso de proteína na farinha de trigo. Segundo CONTAMINE et al. (1995) a ausência do fenômeno de retração é considerada um bom fator de qualidade positivo para o processo e que determina o potencial de acondicionamento dos biscoitos.

O uso de proteases é útil no processamento do *cracker* podendo também acelerar o condicionamento do glúten no período de fermentação. No processo convencional de *crackers*, os estágios esponja e massa, que envolvem 18 e 6 horas de fermentação, respectivamente, podem ser bastante reduzidos, o que também resulta no aumento da produtividade (VITTI et al., 1988).

As enzimas diminuem a consistência da massa e a resistência a extensão, modificam a extensibilidade e promovem uma melhoria no processo fermentativo, em função da liberação de compostos nitrogenados (nitrogênio solúvel, peptídeos e aminoácidos) (FANCE, 1976).

Através da adição de proteases, farinhas de trigo com maiores teores de glúten podem ser usadas para produção de biscoitos, tornando as massas mais macias, plásticas e extensíveis (SPRÖBLER, 1981).

JOHNSON & MÜLLER (1953) mostraram em seus trabalhos que as proteases diminuem a consistência da esponja durante a fermentação, o que pode ser facilmente observado através de um farinógrafo. Os parâmetros pH, temperatura, concentrações de protease e oxidantes, são fatores diretamente relacionados com a ação das proteases e a consistência da massa.

PETIT & AUDIDIER (1967) e ISHIDA & NAGASAKI (1989b) através do uso do farinógrafo, registraram modificações perceptíveis na consistência da massa farinha-água durante a mistura, em função da adição de doses crescentes de uma protease bacteriana (*Bacillus subtilis*).

#### **4.1.2. Modificações na solubilidade, viscosidade das proteínas e perfis eletroforéticos das proteínas**

A fermentação da esponja resulta na diminuição da viscosidade relativa e no aumento da solubilidade, à medida que a proteína tem o tamanho reduzido por ação das proteases, ocorrendo diminuição no peso molecular (DOESCHER & HOSENEY, 1985a). As modificações na proteína (alta solubilidade e baixa elasticidade) são devidas às quebras de ligações dissulfeto e às substâncias redutoras produzidas (WU & HOSENEY, 1990).

Segundo FANCE (1976), as proteínas solúveis são hidrolisadas em peptonas e polipeptídeos podendo ser assimiladas pelas leveduras, para seu crescimento e desenvolvimento. Este efeito pode ser observado na mudança da cor da massa, que torna-se mais clara gradualmente com o processo da fermentativo.

Proteases de leveduras têm sido utilizadas na indústria de panificação por causarem um certo grau de solubilidade das proteínas, o que é importante para suas propriedades funcionais na massa (WOODS et al., 1980).

Estudos sobre as mudanças químicas na proteína da farinha de trigo usando a técnica de Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram realizados por muitos pesquisadores (DANNO & HOSENEY, 1982a; NG & BUSHUK, 1987; SHIIBA et al, 1990, LIN & HOSENEY, 1993; WANNERBERGER et al., 1996).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) de proteínas solubilizadas através de um tratamento com (SDS), não é uma metodologia recente, mas vem sendo amplamente utilizada em estudos de proteínas do trigo (BUSHUK, 1996). As bandas protéicas reveladas no gel eram comparadas visualmente, portanto limitavam-se a uma análise subjetiva. Apartir dos estudos de KERSTERS & DE LEY (1975) a análise de bandas protéicas passou a ser feita por densitometria, com auxílio de computador, promovendo assim análises rápidas, fáceis e de muita utilização na identificação de proteínas.

As técnicas eletroforéticas conjuntamente com outras de quantificação e identificação de proteínas são bastante utilizadas nos estudos das proteínas do trigo.

#### **4.2. *Efeito nos tempos de mistura***

Os tempos de mistura da esponja e massa são pontos críticos e importantes no processamento. Tempos de mistura excessivos poderão causar prejuízos e variações na qualidade do produto. (BARRET, 1975; PYLER, 1982).

O enfraquecimento do glúten pela ação das proteases nas proteínas da farinha durante a fermentação permite a redução do tempo de mistura (POMERANZ, 1966; GAMS, 1976). Segundo COLE (1973) e PYLER (1982) pode-se reduzir em até 30% o tempo de mistura da massa, sem prejudicar as suas propriedades e a qualidade do produto final.

No processamento de biscoitos deve-se limitar, ao máximo, o inchamento das partículas proteicas durante a mistura da massa. Essa é a razão de se reduzir ao mínimo o grau de hidratação, através da adição de açúcares e outros ingredientes secos que absorvam uma parte da água disponível. 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. Desta maneira, 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 (GUÉRIVIERE & BUSSIÈRE, 1974).

#### **4.3. Efeito no produto final**

As proteases têm ação direta no condicionamento da massa durante o processamento dos *crackers*, influenciando nas suas propriedades organolépticas. Neste item serão observados os efeitos das proteases na cor, sabor e textura dos biscoitos (BARRET, 1975; KRÜGER & REED, 1988).

##### **4.3.1. Efeitos na cor e sabor**

A hidrólise enzimática das proteínas da farinha leva à formação de grupos  $\text{NH}_2$  e  $\text{COOH}$ . Os grupos  $\text{NH}_2$  assim liberados podem reagir com os açúcares redutores presentes na formulação, ou produzidos pela ação da  $\alpha$ -amilase, favorecendo a reação de Maillard responsável pela melhoria da cor, sabor e aroma dos biscoitos (HASEBORG, 1981; LYONS, 1982).

As reações de Maillard ocorrem na faixa de 160 °C a um pH da massa entre 5,0 e 5,5, e são responsáveis pelas principais mudanças envolvidas na formação das características da cor do produto. Os produtos destas reações também contribuem muito para o sabor do produto. A temperatura dessa ordem pode ser alcançada na massa somente quando a absorção do calor torna-se substancialmente maior que a perda de calor através da evaporação da água (MARSTON & WANNAN, 1983)

Durante a fermentação a atividade dos microrganismos diminui e os aminoácidos liberados pelas proteases são acumulados. Durante o cozimento esses aminoácidos reagem com açúcares (reação de Maillard), sendo que a velocidade da reação depende do aminoácido (EL DASH, 1971). Segundo o autor a reação de Maillard envolve a intervenção de um próton, suprido pelo aminoácido formado durante a fermentação.

A influência da adição de enzimas proteolíticas de origem vegetal (papaina) e fúngica no aroma e no sabor de produtos de panificação foi pesquisada por EL DASH & JOHNSON (1967). Verificaram que o aroma é atribuído a um aumento na formação de compostos carbonílicos, causado pela ação enzimática.

O sabor, a textura e a aparência dos produtos de panificação são dependentes das interações entre os vários ingredientes utilizados no processamento. Por considerarem as propriedades individuais dos ingredientes MOONEN & KIRSCH (1995) sugeriram uma abordagem no alimento como um todo, com pesquisas direcionadas para as funções dos vários ingredientes, assim como a composição da farinha de trigo, a importância das enzimas, dos emulsificantes, dos extratos de leveduras, para obtenção de uma melhor qualidade do produto final.

As proteases afetam as propriedades organolépticas, tendo efeito significativo na acentuação da cor e do sabor. EL DASH & JOHNSON (1967) identificaram 70 compostos, os quais contribuíram para o sabor do pão. Alguns deles são formados

durante a fermentação, sendo responsáveis pelo aroma do pão, enquanto que outros são formados durante o cozimento e afetam o aroma, sabor e cor

#### 4.3.2. Efeito na textura

Os efeitos das proteases nas propriedades plásticas do glúten são também observados na textura do produto final. A dispersão ou enfraquecimento da rede de proteína da massa pelas proteases possibilita a formação de um produto mais friável, de menor densidade e dureza e melhor aparência geral (MONNIER & GODON, 1975; LIN et al., 1993).

SPRÖßLER (1981) afirmou em seus trabalhos que, por meio da adição de protease bacteriana ou papaína, no processamento de biscoitos, a qualidade do produto final foi melhorada com relação à porosidade e resistência à ruptura. Resultados similares com relação aos efeitos das proteases no controle da textura dos biscoitos, foram citados por JOHNSON & MÜLLER, 1953; EL DASH & JOHNSON, 1967; BARRET, 1975; LIN, 1993.

Com relação à medida instrumental de *crackers*, GAINES (1991) considera complicada, tendo em vista a natureza heterogênea e inconstante de suas estruturas. A geometria dos *crackers* facilita a penetração do calor no cozimento favorecendo uma elevação de umidade no centro do produto e nas células da estrutura dos *crackers*. Afirma também que o conteúdo de umidade no produto tem significativa influência nos vários aspectos da textura medida nos biscoitos.

Uma técnica ultrasônica não destrutiva foi utilizada por JUODEIKIENE (1994) na medida dos parâmetros dos poros em *crackers*. Os sinais de amplitude ultrasônicos transmitidos através dos *crackers* foi determinado juntamente com a densidade, número e diâmetro dos poros nas camadas externas e internas. Os resultados mostraram que os *crackers* poderiam ser considerados um alimento de multi-camadas; a camada externa é mais densa e menos porosa do que a camada interna. A dependência da amplitude na

densidade e porosidade confirma a aplicabilidade dos métodos acústicos para avaliação da textura dos alimentos.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### A. Material

##### 1. Matéria Prima

Nos testes laboratoriais foi utilizada farinha de trigo tipo especial procedente do moinho Pacífico, localizado em Santos-SP, Brasil, a qual foi acondicionada em sacos de polipropileno e estocada em câmara fria a -20°C.

##### 2. Reagentes e Ingredientes

- Protease fúngica, fornecida pela PROZYN - Indústria e Comércio Ltda-São Paulo – SP comercialmente chamada de PROTEZYN FX, com atividade de 3.100 Unidades de Hemoglobina por grama(HU/g), obtida a partir de uma cepa selecionada de *Aspergillus niger*.
- Protease bacteriana, fornecida pela PROZYN - Indústria e Comércio Ltda - São Paulo –SP comercialmente chamada de PROTEN, com atividade de 3100 Unidades de Hemoglobina por grama(HU/g), obtida através da fermentação controlada do *Bacillus subtilis*.
- Padrão de peso molecular de proteínas para eletroforese adquirido da Pharmacia: tiroglobulina (669.000), ferritina (440.000), catalase (232.000), lactato desidrogenase(140.000) e albumina (67.000).
- Fermento biológico, cloreto de sódio e bicarbonato de sódio adquiridos no comércio de Campinas, São Paulo

- Gordura hidrogenada e lecitina de soja concedidas pela SANBRA - Sociedade Algodoeira do Nordeste Brasileiro S/A
- Malte não diastático fornecido pela WANDER S/A - Produtos Alimentícios e Dietéticos, São Paulo.

### **3. Aparelhos e equipamentos**

Na caracterização química da farinha de trigo, nos testes reológicos, no estudo das mudanças químicas nas esponjas do *cracker*, na elaboração dos biscoitos e análises do produto final, foram utilizados os aparelhos e equipamentos descritos abaixo:

- Agitador Magnético Marconi TE-089
- Agitador orbital TE-140 Tecnal
- Assadeira de aço carbono tipo VC1450
- Balança analítica Bosch, MOD. S2000
- Balança analítica Mettler, AE200
- Balança semi-analítica Mettler, P1200
- Calibre de folga
- Cabine e boleadora do Extensógrafo
- Centrifuga - SORVAIL RC-5B-ROTOR SS-34
- Cilindro de laminação
- Cuba de eletroforese
- Densitômetro Pharmacia com Software Imagermaster ID
- Dessecador
- Destilador de nitrogênio Tecnal, MOD. TE-036-E
- Determinador de atividade  $\alpha$ -amilase Falling Number 1800
- Digestor de proteínas Technicon BD-40
- Do-corder Brabender
- Espectofotômetro MACBETH color eyer colorimeter, MOD 3000
- Estufa de secagem com circulação mecânica de ar, FANEM 320-SE

- Extensógrafo Brabender
- Farinógrafo Brabender
- Forno elétrico estático Scarcelli
- Gel Dryend BIO RED
- Liofilizador - Freezone Stoppering Spray Dryer - Freeze Dry System MOD 79 480
- Maturógrafo Brabender
- Medidor de umidade por infravermelho AND, MOD AD4714A
- Moldador-cortador
- Mufla FANEM MOD.143
- Paquímetro
- Potenciômetro Metrohm Herisau-E550
- Rheomat 115 Contraves
- Rheomat 115 Contraves - ROTOR 1045-MOD.7/7
- Scanner Sharp JX 330
- Seladora Lorenzetti
- Sistema de eletroforese PROTEAN XII CELL (BIO-RAD)
- Texture Analyser TA XT2
- Viscoamilografo Brabender

## **B Métodos**

### **1. Caracterização física, físico-química e reológica da farinha de trigo**

#### *1.1. Umidade*

Método nº 44-15, A.A.C.C. (1983)

## **1.2. Proteínas**

Método nº 46-13, A.A.C.C. (1983), utilizando-se o fator de conversão 5,75 para cálculo do teor de proteína

## **1.3. Cinzas**

Método nº 08-01, A.A.C.C. (1983)

## **1.4. Lipídios**

Método de BLIGH & DYER (1959)

## **1.5. Número de queda**

Método nº 56-81B, A.A.C.C. (1983)

## **1.6. pH**

Método nº 02-52, A.A.C.C. (1983)

## **1.7. Glúten úmido e seco**

Método nº 38-10, A.A.C.C. (1983)

## **1.8. Avaliação das propriedades de mistura da massa**

As propriedades de mistura da farinha de trigo foram determinadas no Farinógrafo Brabender, segundo A.A.C.C. (1983), método nº 54-10. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

Absorção de água: quantidade de água (%) necessária para o centro da curva alcançar a linha de 500 Unidades Farinográficas (UF).

Tempo de chegada tempo (em minutos) necessário para o topo da curva alcançar a linha de 500 Unidades Farinográficas (UF).

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

Estabilidade: 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.

### ***1.9. Avaliação das propriedades extensográficas da massa***

As propriedades extensográficas da farinha de trigo foram avaliadas pelo Extensógrafo Brabender de acordo com A.A.C.C. (1983), método nº 54-10. Foram determinados os seguintes parâmetros:

Resistência à extensão ou elasticidade (R): é a altura da curva extensográfica, a 50mm da origem, expressa em unidades extensográficas (UE)

Resistência máxima (RM): altura máxima da curva medida em unidades extensográficas (UE)

Extensibilidade (E): comprimento (em mm) do extensograma medido desde o início até o final da curva

## **2. Processamento e avaliação da qualidade do *cracker***

Foi utilizado o método “esponja e massa” para a produção do biscoito tipo *cracker* a nível laboratorial, baseado no trabalho apresentado por HAMED-FARIDI (1979), com algumas modificações na formulação e procedimento.

Na primeira etapa do processo foi feito o preparo da esponja através da mistura de parte dos ingredientes da formulação. Após a fermentação da esponja foi preparada a massa, pela mistura da esponja fermentada, com os demais ingredientes, a qual foi fermentada e finalmente submetida às etapas de laminação, corte, cozimento e resfriamento.

## 2.1. Formulação

No preparo da esponja e da massa do *cracker* foi usada a seguinte formulação:

**Tabela 1 - Formulação do cracker**

<b>Ingredientes*</b>	<b>Esponja (%)</b>	<b>Massa (%)</b>
Farinha de Trigo	65	35
Água	25	-
Gordura	6,5	6,5
Levedura	0,5	
Malte não diastático		2,0
Bicarbonato de sódio	-	0,45
Sal	-	1,7
Lecitina de soja	-	0,1

\*Bascados no peso total da farinha

## 2.2. Mistura e fermentação da esponja

Foram testados vários misturadores optando-se pelo uso do misturador do Farinógrafo Brabender acoplado ao Do-Corder. O processo de mistura da esponja foi realizado em uma velocidade de 32 rpm. Em testes preliminares realizados, encontrou-se uma melhor homogeneização das misturas quando foi usado este tipo de misturador.

A esponja foi preparada adicionando-se no misturador Do-Corder a farinha de trigo, a água, a gordura e o fermento nas proporções estabelecidas na Tabela 1.

A mistura dos ingredientes da esponja foi feita a 32 rpm por 3 minutos a temperatura de 30°C. A seguir a esponja foi transferida para bequer (coberto com plástico), o qual foi transferido para cabine de fermentação, a 30 C 3 e umidade relativa de 90%, por 18 horas.

### **2.3. Mistura e fermentação da massa**

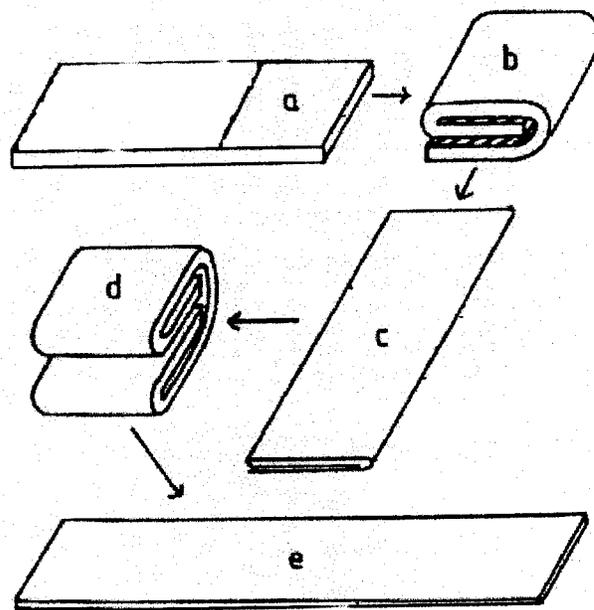
No estágio de mistura da massa foram adicionados à esponja fermentada, a gordura, a farinha de trigo, o malte, o bicarbonato de sódio, o sal e a lecitina, conforme formulação (Tabela 1). Os ingredientes foram homogeneizados no misturador Do-Corder a 64 rpm durante 5 minutos, a temperatura ambiente. A massa foi colocada em bequer (coberto com plástico), o qual foi a seguir transferido para a cabine de fermentação. A massa foi fermentada, a 30°C e umidade relativa de 90%, por 6 horas.

### **2.4. Laminação e corte da massa**

A laminação da massa foi realizada de acordo com o procedimento descrito por WADE (1972a) com algumas modificações. A massa do *cracker* foi laminada mecanicamente por várias passagens no cilindro até a folha de massa atingir uma espessura de 2,0 mm, controlada com calibre de folga.

A seguir iniciou-se o processo de dobra seguido de redução da espessura da folha, usando o cilindro. A espessura inicial de 2,0 mm foi reduzida gradativamente a 0,6 mm, conforme indicado na Figura 5.

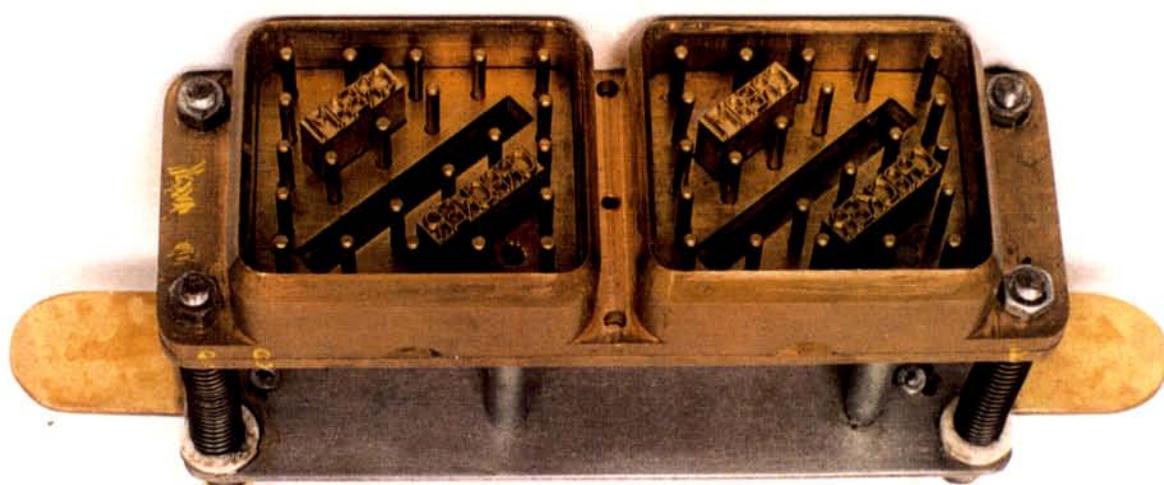
Cada etapa do processo de dobra foi realizado duas vezes, o que totalizou 12 passagens no cilindro.



**Figura 5 – Seqüência das dobras e laminação da massa do *cracker***

Fonte: WADE (1972a)

A massa laminada foi finalmente estampada manualmente em um moldador-cortador especial para *cracker*, fabricado com latão e similar ao usado industrialmente (Figura 6). Os biscoitos estampados e cortados foram colocados, com auxílio de uma espátula, em assadeiras metálicas previamente aquecidas no forno à  $245^{\circ}\text{C} \pm 5$ .



**Figura 6 – Moldador–cortador para *cracker***

### **2.5. *Cozimento e resfriamento***

As assadeiras contendo as massas de *cracker* cru estampadas e cortadas foram transportadas para forno elétrico estático para cozimento à temperatura de 250°C, por 3,5 a 4,0 minutos.

Após o cozimento os biscoitos foram resfriados à temperatura ambiente por 30 minutos e embalados em sacos plásticos.

### **3. Avaliação da qualidade dos crackers processados em laboratório**

A qualidade dos *crackers* foi avaliada através das determinações de pH, umidade e medidas físicas: peso do *cracker* cru (g), peso do *cracker* cozido e resfriado (g), comprimento (cm), largura (cm), espessura (mm), volume (cm<sup>3</sup>), densidade (g/cm<sup>3</sup>). Foram também avaliados a cor e textura dos biscoitos, através de medidas instrumentais.

#### **3.1. Determinação do pH**

Na determinação do pH foi utilizado o método citado por BRUNO (1989). Foram pesados 10g de biscoito previamente triturado em bequer de 250ml e posteriormente adicionado 150ml de água destilada. A mistura foi submetida a agitação mecânica durante 5 minutos. Em seguida a suspensão foi deixada decantar por 10 minutos e feita a leitura do pH no líquido sobrenadante. As determinações de pH foram feitas em triplicata.

#### **3.2. Determinação da Umidade**

Amostras de cinco biscoitos foram trituradas em almofariz. A determinação de umidade, em triplicata, foi feita usando-se o aparelho infravermelho em 5g da amostra triturada.

#### **3.3. Medidas físicas do produto**

As medidas físicas dos *crackers* foram realizadas em 30 unidades de biscoitos. Os parâmetros analisados foram: peso dos *crackers* crus (g) peso dos *crackers* cozidos (g) espessura do *crackers* (cm), largura dos *crackers* (cm), volume dos *crackers* (cm<sup>3</sup>).

##### **3.3.1. Peso dos crackers crus (g)**

A pesagem foi realizada em 30 unidades de *crackers* crus, após a moldagem e corte, usando balança analítica.

### **3.3.2. Peso dos *crackers* cozidos e resfriados (g)**

Foram pesados 30 unidades de *crackers* cozidos após resfriamento por 30 minutos usando balança analítica.

### **3.3.3. Espessura dos *crackers* (cm)**

A espessura do *crackers* (cm) foi determinada em 30 unidades de *crackers* cozidos e resfriados, utilizando-se um paquímetro.

### **3.3.4. Comprimento dos *crackers* (cm)**

Foram realizadas medidas do comprimento (cm) em 30 unidades de *crackers*, de ponta a ponta, na mesma direção (paralela a parede lateral do forno), usando paquímetro, segundo relatado por WADE (1972a).

### **3.3.5. Largura dos *crackers* (cm)**

Foi medida a largura (cm) de 30 unidades de *crackers*, de ponta a ponta, na mesma direção (perpendicular a parede lateral do forno) usando paquímetro, segundo WADE (1972a).

### **3.3.6. Volume dos *crackers* (cm<sup>3</sup>)**

A determinação do volume dos *crackers* foi realizada em 30 unidades de *crackers*, pelo método do deslocamento de sementes de painço.

A densidade (g/cm<sup>3</sup>) foi calculada pela relação entre a massa dos *crackers* cozidos e resfriados (g) e o volume (cm<sup>3</sup>).

### 3.4. Análises instrumentais

As análises instrumentais de textura e de cor foram feitas em 30 unidades de *crackers*.

#### 3.4.1. Análise de textura

A textura dos *crackers* foi determinada através da análise do parâmetro ruptura, utilizando-se o analisador de Textura TA.XT2, e o software XTRA Dimension V# 7G da Stable Micro System.

Cada unidade de *cracker* foi colocada individualmente em uma placa de alumínio em forma de U, com uma abertura circular de 60mm. Um probe de bola (TA-18) de aço inoxidável com ½” de diâmetro foi dirigido para o centro de cada *cracker*, a uma velocidade de 5mm/s e uma profundidade de 8mm. O texturômetro foi ajustado de acordo com a técnica descrita pelo fabricante do aparelho para análise de *crackers*:

Força “threshold”: 20,0g

Distância “threshold”: 0,50mm

Força de contato: 5,0g

Velocidade do teste: 5,0mm/s

Velocidade do pré e pós teste = 5,0mm/s

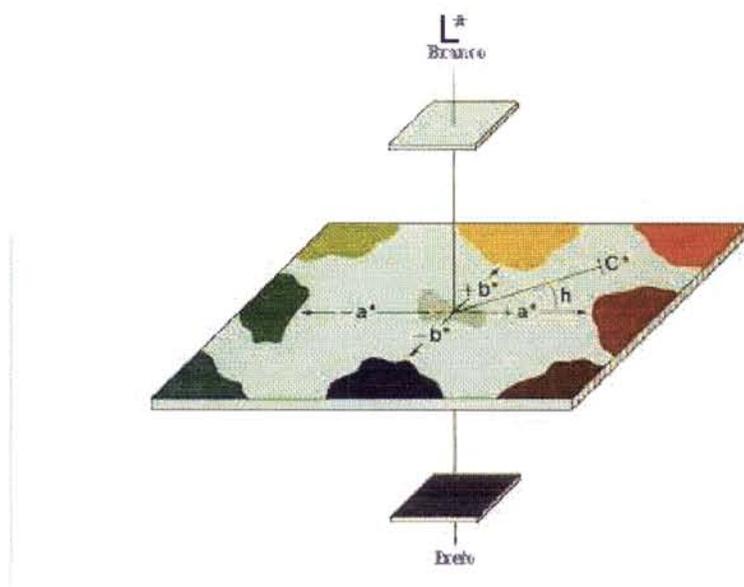
Distância: 10mm

Distância da ruptura: 8,0mm

#### 3.4.2. Análise de Cor

A determinação da cor dos *crackers* foi obtida através do espectrofotômetro, seguindo o sistema CIE-Lab, medindo os valores L, a\*, b\* com iluminante D e ângulo 10°, onde os valores de L, (luminosidade ou brilho) flutuam entre zero (preto) e 100 (branco), no eixo [-a\* (verde) até + a\* (vermelho)] e no eixo [-b\* (azul) até + b\*

(amarelo)], na faixa de comprimento da onda de 360-740nm, cuja representação esquemática encontra-se na Figura 7.



**Figura 7 – Esquema do Sistema CIE-LAB para cores**

## **4. Avaliação das mudanças na esponja e na massa do *cracker* durante a fermentação nos ensaios experimentais**

As mudanças na esponja e na massa do *cracker* durante a fermentação foram avaliadas através das propriedades extensográficas da massa, do pH das esponjas e massas e das determinações da solubilidade e viscosidade das proteínas das massas. Os perfis eletroforéticos das proteínas totais das massas foram analisados visualmente e através do dendograma.

### **4.1. *Preparo da esponja e da massa do cracker***

As esponjas foram preparadas, no misturador do Farinógrafo adicionando-se farinha de trigo (65%), fermento (0,5%), água (25%) e gordura (6,5%) e homogeneizando-se a mistura a 32 rpm por 3 minutos, à temperatura de 30°C. A seguir, a esponja foi colocada em bequer de 1.000ml e submetida a fermentação em cabine à 30°C e umidade relativa de aproximadamente 90%, nos tempos de 0, 4, 8, 12 e 18 horas.

A esponja fermentada foi colocada no misturador do Farinógrafo e misturada (32 rpm; 30°C) com a gordura (6,5%), o sal (1,7%), o bicarbonato de sódio (0,45%), o malte não diastático (2,0%) e a lecitina (0,1%). Os tempos de mistura da massa variaram de 3 e 5 minutos, com base em testes preliminares.

### **4.2. *Determinação das propriedades extensográficas das massas de cracker***

A avaliação das propriedades extensográficas das massas foi feita pela análise das curvas extensográficas das mesmas, conforme o procedimento descrito por WU & HOSENEY (1990).

As massas preparadas conforme item 3.1 foram divididas em duas partes de 150g  $\pm$  0,1g cada, boleadas e moldadas nas unidades do Extensógrafo Brabender e levadas à câmara de descanso, a 30°C e UR de 90%, por 45 minutos.

Após o descanso das massas foi realizado o teste no Extensógrafo para a obtenção das curvas extensográficas.

Na análise das curvas extensográficas foram determinados os parâmetros: resistência à extensão e resistência máxima, em unidades extensográficas (UE) e a extensibilidade, em mm, conforme definido no item 1.9. de material e métodos. Foram obtidas quatro curvas extensográficas.

#### ***4.3. Determinação do pH das esponjas e das massas do cracker***

Os valores de pH das esponjas (recém preparadas e após fermentação) e das massas preparadas fermentadas e não fermentadas (conforme item 3.1 de Material e Métodos), foram determinados pelo procedimento descrito por BRUNO (1989).

Foram triturados 30 g da massa em 100 ml de água destilada no liquidificador, por 1 minuto. A suspensão foi transferida para bequer de 500 ml, submetida à agitação mecânica e em seguida realizada a leitura do pH no potenciômetro. As determinações foram feitas em triplicata.

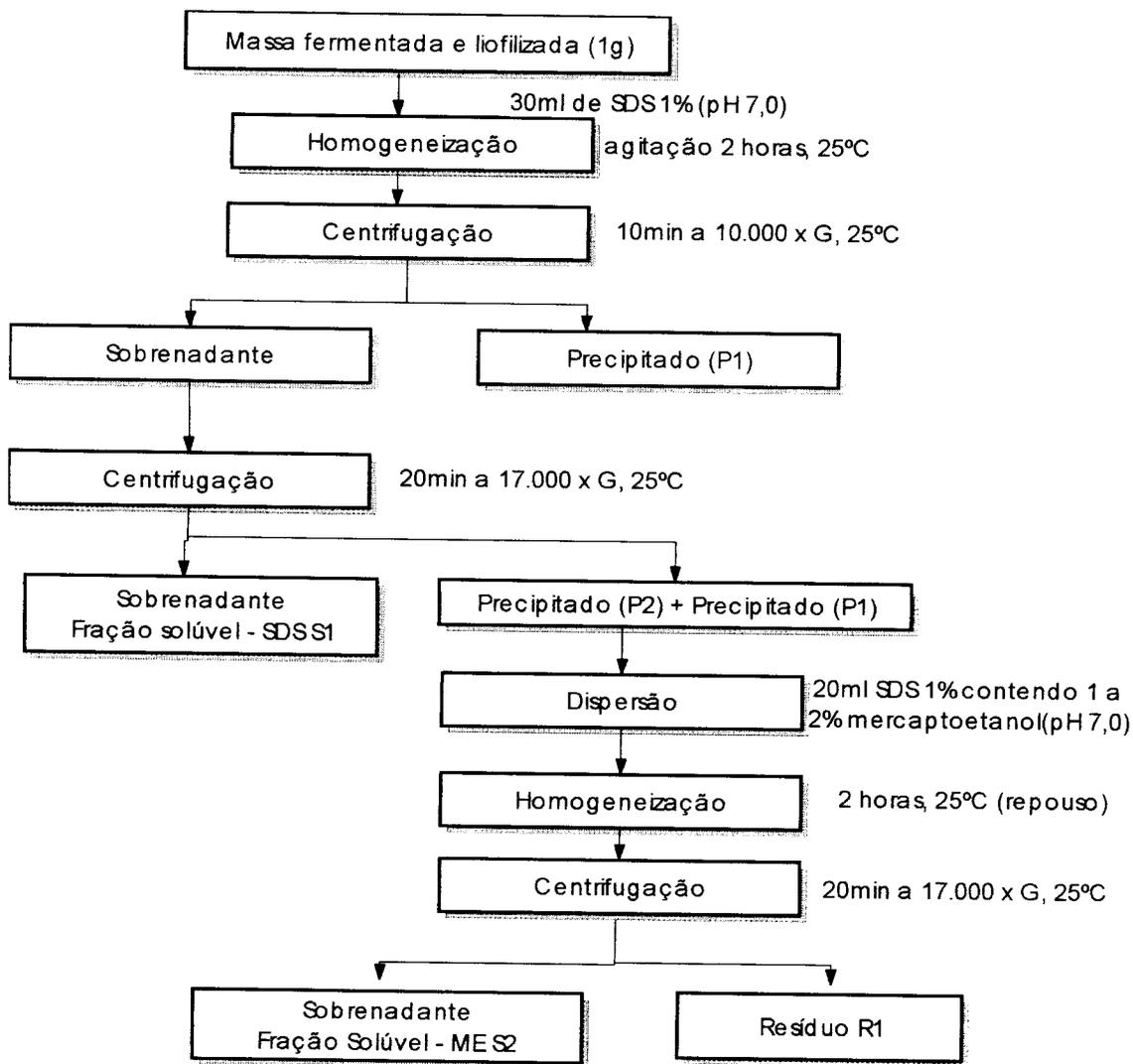
#### ***4.4. Extração das proteínas das massas fermentadas***

As massas preparadas conforme item 3.1 de material e métodos foram liofilizadas, trituradas em almofariz e estocadas em recipientes de vidro a 4°C.

A extração das proteínas da massa fermentada e liofilizada, foi realizada de acordo com a técnica descrita por DANNO & HOSENEY (1982a).

Pesou-se 1g da massa, diretamente em tubo de 50 ml de centrifuga, adicionando-se 30ml de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 1% (pH 7,0). A suspensão contida nos tubos foi, então, colocada em agitador orbital por 2 horas, à temperatura ambiente, homogeneizando-se a cada intervalo de 10 minutos.

A suspensão obtida foi, então, centrifugada por 10 minutos a 10.000 x g a 25°C. O líquido sobrenadante foi decantado, transferido para outro tubo e centrifugado a 17.000 x g, a 25°C por 20 minutos. Os dois precipitados resultantes foram misturados e dispersados em 20 ml de SDS a 1%, contendo 2-mercaptoetanol (pH 7,0). Depois de permanecer em repouso durante 2 horas à temperatura ambiente, a suspensão foi, então, centrifugada a 17.000 x g a 25°C por 20 minutos. O procedimento de extração da proteína está sumarizado na Figura 8.



**Figura 8 – Esquema para extração das proteínas das massas fermentadas liofilizadas**

#### **4.5. Determinação da solubilidade das proteínas das massas fermentadas**

A determinação da solubilidade das proteínas das massas fermentadas foi realizada na fração solúvel em SDS (S1), obtida na extração das proteínas, conforme descrito no item 3.4 de Material e Métodos.

A fração, S1, foi diluída em SDS 1% (peso/volume), pH 7,0, em balão volumétrico de 50 ml. Foram retiradas alíquotas de 10 ml, em triplicatas, para a determinação do teor de nitrogênio pelo método de Kjeldahl, segundo A.A.C.C. (1983).

A solubilidade de proteínas da massa foi determinada pela dosagem do nitrogênio na fração solúvel, calculando-se índice de solubilidade do nitrogênio (ISN) expresso em percentagem, através da relação entre nitrogênio na fração solúvel e nitrogênio total da amostra.

#### **4.6. Medida de viscosidade das proteínas da massa fermentada**

A viscosidade dos extratos de proteínas foi determinada na fração S1 obtida conforme descrito no item 3.4. de Material e Métodos. Foi usado o Reômetro Contraves Rheomat 115, de cilindros concêntricos, no sistema de medidas MS-1075, cujo cilindro é de anular fixo e casca cilíndrica rotativa de copo invertido, com faixa de taxa de deformação de  $24,0$  a  $3640\text{S}^{-1}$ , mostrada na Tabela 2.

Na obtenção das medidas experimentais foram adicionados 35 ml da amostra no copo inserido a casca rotativa, (conforme recomendação do fabricante) e deixado por 10 minutos, em rotação, para que a temperatura desejada de  $30^{\circ}\text{C}$  fosse alcançada. Os valores de leitura de torque foram obtidos a cada intervalo de 1 minuto, para cada sequência de amostras, variando-se a velocidade de rotação de 5,15 a 780 rpm. Os experimentos foram feitos em duplicata e para cada repetição foi usada uma amostra similar a anterior.

**Tabela 2- Rotação, taxa de deformação e constante de multiplicação (K) utilizados no sistema MS-DIN 10-75 – Reômetro Contraves Rheomat 115<sup>3</sup>**

Nº	Rpm	D(s <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	K <sup>1</sup>
1	5,15	24,0	2,73
2	7,37	34,4	1,908
3	10,54	49,2	1,334
4	15,09	70,5	0,932
5	21,6	100,9	0,651
6	30,9	144,3	0,455
7	44,3	207	0,317
8	63,4	296	0,222
9	90,7	423	0,1550
10	129,8	606	0,1083
11	185,8	868	0,0757
12	266	1242	0,0529
13	381	1779	0,0369
<b>14</b>	<b>545</b>	<b>2540</b>	<b>0,0258</b>
15	780	3640	0,01802

<sup>1</sup> K Constante de multiplicação

<sup>2</sup> D(S<sup>-1</sup>) taxa de deformação

<sup>3</sup> Todos os dados da tabela 2 foram fornecidos pelo fabricante do equipamento

O valor da viscosidade aparente foi calculado multiplicando-se o valor do torque obtido em cada 1 minuto pela constante do instrumento (K), correspondente a cada uma das rotações do aparelho (Tabela 2). Dos quinze valores encontrados, optou-se pelo valor de torque correspondente a rotação de 545 rpm, em todos os ensaios realizados, por apresentar melhor uniformidade nos valores obtidos.

Os resultados obtidos foram avaliados através de uma representação comparativa, onde foi calculada a viscosidade relativa como a relação entre a viscosidade aparente do extrato de proteína da massa em cada tratamento com adição de enzima e a

viscosidade aparente do extrato de proteína da massa no tratamento sem adição de enzima.

$$V_R = \frac{\eta_{ap} \text{ massa no instante t}}{\eta_{ap} \text{ convencional no instante t}}$$

#### 4.7. Eletroforese das proteínas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

As proteínas totais foram extraídas das massas conforme descrito no item 3.4. de Material e Métodos, sendo usada a fração solúvel SDS (S1) para análise de proteínas totais por eletroforese em gel, conforme técnica proposta por LAEMMLI (1970).

##### 4.7.1. Preparo dos géis de SDS-PAGE

Os reagentes e as soluções utilizadas na preparação de gel de separação SDS-PAGE 12% e gel de concentração SDS-PAGE 4% e seus respectivos volumes estão indicados na Tabela 3.

**Tabela 3 - Materiais usados nos géis de separação e de concentração**

Solução estoque	Gel de separação	gel de concentração
Concentração do monômero	(12%)	(4%)
Acrilamida (30%) , e bis acrilamida <sup>1</sup> 0,8%	20,0 ml	0,625 ml
TRIS-HCl <sup>1</sup> (1,5M pH 6,8)	12,5 ml	-
TRIS-HCl (0,5M pH 8,8)	-	1,25 ml
Água destilada	16,75 ml	3,05 ml
SDS <sup>2</sup> 10% (peso/volume)	0,50 ml	50 µl
Persulfato de amônio 10%	250 µl	25 µl
TEMED <sup>3</sup>	25 µl	5 µl

<sup>1</sup>Tris-HCl (solução de trizma base com pH ajustado com HCl), <sup>2</sup>SDS (dodecil sulfato de sódio); <sup>3</sup>TEMED (N, N, N', N'Tetrametileno diamino)

No preparo do gel de separação foi utilizado o sistema de Eletroforese PROTEAN XII CELL (BIO RAD) adicionando-se as soluções de acordo com a seqüência indicada na Tabela 3. As soluções de acrilamida/bis, Tris-HCl pH 8.8, água destilada e SDS 10% foram adicionadas em bquer de 100 ml e homogeneizadas lentamente. Em seguida, foi feita a deaeração durante 15 minutos usando bomba de vácuo. Posteriormente, foram separados 2ml da mistura deaerada, para preparação de um selante, a ser aplicado nas placas de vidro para evitar vazamento do gel. Foram adicionados aos 2ml da mistura deaerada, 14µl de TEMED e 20µl de persulfato de amônia, seguindo-se imediatamente a selagem lateral das placas de vidro, que ocorreu após aproximadamente 5 minutos, devido a completa polimerização do selante. Posteriormente, foi acrescentado à mistura do gel de separação, o iniciador (persulfato de amônia) e o catalizador da reação (TEMED). Imediatamente a mistura foi transferida para um sistema de 2 placas de vidro, previamente montado com espaçadores de teflon, até a marca indicada.

O gel de concentração foi preparado usando-se a mesma técnica descrita. A mistura líquida do gel de empacotamento foi adicionada sobre o gel de separação, e sobre esta, uma barra de teflon com 13 canaletas, para formação de espaços vazios para subseqüente aplicação das amostras, do controle e do padrão. A polimerização foi feita à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos.

#### **4.7.2. Preparação das amostras**

Aliquotas de 2ml das amostras de proteínas totais da fração solúvel-S1, dos controles e dos padrões do peso molecular conhecidos foram diluídos em 4ml de tampão da amostra pH 6,0, preparado segundo (LAEMMLI, 1970) e posteriormente fervidos a 95°C durante 4 minutos. Após resfriamento, foram injetados 50µl das amostras, e do controle e 25µl do padrão, com uma micropipeta, nas canaletas formadas no gel de concentração.

#### **4.7.3. Eletroforese**

As placas de vidro, contendo os géis foram transferidas para a cuba acrílica de eletroforese. Esta foi preenchida com 1,5 l de solução tampão de corrida, seguindo-se a conexão dos eletrodos com amperagem de 60 mA, sendo a voltagem de 400 volts e o tempo de corrida de 14 horas. Foram usados como padrões as proteínas: Tiroglobulina (PM:669,000), Ferritina (PM:440000), Catalase (PM:232,000), Lactase desidrogenase (PM:140,000) e Albumina (PM:67,000), adquiridos da Pharmacia.

#### **4.7.4. Coloração de proteínas por Coomassie Blue R - 250**

Após a corrida eletroforética, o gel foi transferido para uma cuba onde foi fixado e revelado através do corante Coomassie Blue (1g de Coomassie Blue em 500ml de metanol, 400ml de água destilada e 100ml de ácido acético glacial), durante 24 horas. Posteriormente o gel foi colocado para descoloração em uma solução contendo 500ml de metanol, 400ml de água destilada e 100ml de ácido acético glacial.

Os tempos de fixação e coloração foram devidamente controlados visando melhorar a reprodutividade das bandas. Na etapa da revelação, o tempo gasto foi dependente do grau de visualização desejado das bandas.

A secagem do gel foi feita em Gel Dryend BIO-RED, sob vácuo a 80°C por duas horas, entre duas folhas de papel celofane. Em seguida, o gel foi fotografado para ser analisado.

#### **4.7.5. Análise do gel SDS-PAGE**

Os perfis eletroforéticos das proteínas totais das amostras foram analisados visualmente quanto à presença ou ausência de bandas em uma determinada altura ou bandas similares agrupadas no gel.

As bandas em estudo foram selecionadas, subjetivamente, tomando como base a reprodutibilidade, a nitidez e a facilidade de visualização. Posteriormente, a confirmação desses agrupamentos se deu mediante a análise do gel pelo densitômetro Pharmacia equipado com Software Imagermaster 1D.

Em seguida, o gel foi escaneado em Scanner Sharp JX 330 e examinado pelo programa computacional, que permitiu a elaboração do densitograma.

## **5. Ensaio experimentais**

Foram realizados cinco ensaios designados por T1, T2, T3, T4 e T5, nos quais foram preparadas esponjas do *cracker* com adição de proteases comerciais (fúngica ou bacteriana) as quais foram fermentadas por 4, 8 e 12 horas. O tratamento T1, sem adição de protease, foi usado como controle, sendo as esponjas fermentadas por 4, 8, 12 e 18 horas.

As concentrações da protease fúngica ou bacteriana usadas na massa do *cracker* foram estabelecidas, através de testes preliminares a nível laboratorial baseados em características da massa e na qualidade do biscoito.

Tratamento T1-Formulação básica sem adição de proteases, correspondente ao processo convencional, usado como controle

Tratamento T2-Formulação básica com adição de 400 ppm de protease fúngica.

Tratamento T3-Formulação básica com adição de 500 ppm de protease fúngica.

Tratamento T4-Formulação básica com adição de 200 ppm de protease bacteriana.

Tratamento T5-Formulação básica com adição de 250 ppm de protease bacteriana.

Foram avaliadas as mudanças na esponja e na massa dos *crackers* através das propriedades extensográficas e pelas determinações do pH e da viscosidade nos tratamentos T1, após 0, 4, 8, 12 e 18 horas de fermentação e nos tratamentos T2, T3, T4 e T5 após 0, 4, 8 e 12 horas de fermentação, conforme metodologia descrita nos itens 3.2, 3.3 e 3.6 de Material e Métodos, respectivamente.

A avaliação da solubilidade das proteínas foi feita nos tratamentos T1, com 0, 12 e 18 horas de fermentação e nos tratamentos T3 e T5 com 12 horas de fermentação, de acordo com o item 3.5 de Material e Métodos.

Os perfis eletroforéticos foram estudados nas amostras correspondes ao tratamento T1, nos tempos de fermentação 0, 12 e 18 horas e nos tratamentos T2, T3, T4 e T5 com 12 horas de fermentação, de acordo com o item 3.7 de Material e Métodos.

A avaliação da qualidade dos *crackers* através da umidade, pH e das medidas físicas e instrumentais foi feita no tratamento T1, com 18 horas de fermentação da esponja (controle) e nos tratamentos T3 e T5 com 12 horas de fermentação, conforme item 3.0 de Material e Métodos.

## 6. Metodologia estatística

A análise estatística foi realizada nos testes reológicos, para a análise das medidas de viscosidade e solubilidade das proteínas e nas medidas físicas e instrumentais do *cracker*.

Na análise da resistência a extensão, resistência máxima e extensibilidade como também, da proteína solúvel em SDS, da viscosidade da proteína, das medidas físicas e instrumentais dos *crackers*, foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, onde cada observação é descrita pelo seguinte modelo matemático:

$$Y_{ijk} = M + T_{ik} + \varepsilon_{ijk}, \text{ sendo } i = 1,2,\dots,5 \quad j = 1,2,\dots,6 \quad k = 1,2,3,4$$

Onde:

M- representa o efeito da média geral

T<sub>i</sub>- representa o efeito de tratamento,

Sendo que:

- Para a análise da proteína solúvel em SDS, os tratamentos utilizados foram:

i=1- 0 hora, tratamento T1(Convencional)

i=2-12 horas, tratamento T1 (Convencional)

i=3- 18 horas, tratamento T1 (Convencional)

i=4-12 horas, tratamento T3 ( fúngica - 500 ppm)

i=5-12 horas, tratamento T5 ( bacteriana - 250 ppm)

- Para a análise das medidas físicas e instrumentais, considerou-se:

i=1, 18 horas, tratamento T1(Convencional)

i=2, 12 horas, tratamento T3 (Fúngica-500ppm)

i=3, 12 horas, tratamento T5 (Bacteriana-250ppm)

- Para a análise da viscosidade da proteína, resistência à extensão, resistência máxima e extensibilidade foram utilizados os seguintes tratamentos:

- i=1, 0 horas, tratamento T1(Convencional)
- i=2, 4 horas, tratamento T1(Convencional)
- i=3, 8 horas, tratamento T1(Convencional)
- i=4, 12 horas, tratamento T1(Convencional)
- i=5, 18 horas, tratamento T1(Convencional)
- i=6, 0 horas, tratamento T2 (Fúngica, 400 ppm)
- i=7, 4 horas, tratamento T2 (Fúngica, 400 ppm)
- i=8, 8 horas, tratamento T2 (Fúngica, 400 ppm)
- i=9, 12 horas, tratamento T2 (Fúngica, 400 ppm)
- i=10, 0 horas, tratamento T3 (Fúngica, 500 ppm)
- i=11, 4 horas, tratamento T3 (Fúngica, 500 ppm)
- i=12, 8 horas, tratamento T3 (Fúngica, 500 ppm)
- i=13, 12 horas, tratamento T3 (Fúngica, 500 ppm)
- i=14, 0 horas, tratamento T4 (Bacteriana, 200 ppm)
- i=15, 4 horas, tratamento T4 (Bacteriana, 200 ppm)
- i=16, 8 horas, tratamento T4 (Bacteriana, 200 ppm)
- i=17, 12 horas, tratamento T4 (Bacteriana, 200 ppm)
- i=18, 0 horas, tratamento T5 (Bacteriana, 250 ppm)
- i=19, 4 horas, tratamento T5 (Bacteriana, 250 ppm)
- i=20, 8 horas, tratamento T5 (Bacteriana, 250 ppm)
- i=21, 12 horas, tratamento T5 (Bacteriana, 250 ppm)

As hipóteses de interesse serão:

$H_0) T_i=0$  (não houve efeito de tratamento),  $\forall i$

$H_1) T_i \neq 0$  (houve efeito de tratamento)

Para testar essas hipóteses, foi utilizado o teste F na análise de variância. Tendo efeito de tratamento, estes foram desmembrados em contrastes ortogonais que forneceram as comparações: tratamento adicional (tempo 18 horas com tratamento

convencional) com os demais; efeito do tratamento utilizado (convencional, com protease fúngica e com protease bacteriana); efeito do tempo (0, 4, 8 e 12 horas); efeito da interação entre tratamento e tempo. O efeito da interação foi ainda desmembrado para se verificar a evolução do fenômeno ao longo do tempo (ajuste da curva de resposta) em cada tratamento.

Sempre que uma hipótese foi significativa, os tratamentos envolvidos foram comparados pelo teste de Tukey.

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Caracterização da Farinha de Trigo

A farinha de trigo utilizada nos testes laboratoriais foi caracterizada através de análises físico-químicas, químicas e reológicas.

#### 1.1. *Composição centesimal da farinha de trigo*

A Tabela 4 apresenta a composição centesimal da farinha de trigo. O teor de proteína obtido foi de 10,32% apresentando-se dentro da faixa (8,5 a 10,5%) recomendada por WU & HOSENEY(1990) para o preparo de esponjas do *cracker*.

A determinação do teor de proteína é segundo KENT (1975) o mais simples e importante teste de qualidade de farinha para *crackers*. Da mesma forma, DOESCHER & HOSENEY (1985b) também mostram que o conteúdo de proteína está relacionado com a qualidade da farinha para *crackers*. Segundo esses autores, a farinha de trigo usada na fase esponja de *crackers* deve ter conteúdo de proteína mais alto que o da farinha usada na fase massa.

O teor de cinzas da farinha de trigo foi superior ao da faixa (0,40-0,48%) recomendada para *crackers* por MAILHOT & PATTON (1988), e ao percentual de cinzas (0,50%) mencionado para farinhas de trigo para *crackers*, por WHITELEY (1971).

O conteúdo de lipídios da farinha de trigo usada foi similar ao valor (1,20%) indicado por MAILHOT & PATTON (1988) para uso em *crackers*.

Tabela 4 - Composição Centesimal da Farinha de Trigo

Constituintes <sup>1</sup>	(%)
Proteínas(Nx5,7)	10,32
Cinzas	0,56
Lipídios	1,28
Umidade	14,28
Carboidratos <sup>2</sup>	73,56

1 As determinações foram feitas em triplicata

2 Os carboidratos foram determinados por diferença

### 1.2. Análises físico-químicas

A farinha de trigo usada nesta pesquisa apresentou valor de pH de 6,08 estando dentro da faixa (5,8 a 6,4) mencionada por PYLER (1982).

Os teores de glúten úmido e seco, da farinha de trigo, foram de 22, 37 e 8,88%, respectivamente. O teor de glúten seco apresentou-se inferior ao intervalo de 11 a 13,9% mencionado por PYLER (1982) para farinhas de trigo recomendado para *crackers*. Entretanto WHITELEY (1971) aponta que para massas fermentadas o intervalo desejado seria de 10 a 11%. O mesmo autor recomenda maiores teores de glúten, quanto mais longos forem os períodos de fermentação e vice-versa. As farinhas para fabricação de biscoitos requerem glúten mais extensível que os recomendados para pães, visto que algumas massas de biscoitos sofrem intensivo manuseio mecânico em curto espaço de tempo. De acordo com KENT (1975) o teor de glúten úmido e seco é normalmente usado para avaliar a qualidade das farinhas para biscoitos, embora WHITELEY (1971) tenha destacado o teor de glúten seco como fator mais importante.

O valor de Índice de Queda encontrado para a farinha de trigo utilizada foi de 475 segundos, o que indicou baixa atividade de  $\alpha$ -amilase. O valor mínimo de 250 segundos foi mencionado por MAILHOT & PATTON (1988) para as farinhas de trigo recomendadas no preparo de *crackers*. Quanto menor o valor do Índice de Queda

("Falling Number") maior será a atividade de  $\alpha$ -amilase da farinha, devido a maior degradação do amido e menor viscosidade da pasta (POMERANZ, 1987).

### **1.3. Testes reológicos**

Os testes reológicos, usando o Farinógrafo e Extensógrafo permitiram avaliar a capacidade de absorção de água e a força da farinha de trigo através das propriedades de mistura e de extensão (elasticidade e extensibilidade) da massa.

#### **1.3.1. Características farinográficas**

Os resultados do farinograma da farinha de trigo estão apresentados na Tabela 5, os quais foram utilizados para avaliar as propriedades de absorção de água e força da farinha.

A taxa de absorção de água da farinha de trigo (56,2%) foi superior ao intervalo citado (48-52%) para uso em *crackers* (MAILHOT & PATTON, 1988). De acordo com ROGERS & HOSENEY (1987) a absorção de água ótima da farinha é um ponto crítico para o desenvolvimento da massa do *cracker*. Massas com alta absorção resultam em produtos pesados e duros, o que prejudica a leveza e crocância desejadas no produto final. A análise dos parâmetros apresentados na Tabela 5, permitiu concluir que a farinha utilizada tem força média a forte. Segundo WU & HOSENEY(1990) farinhas fortes são apropriadas para a fase esponja no processamento do *cracker*, pois como resultado da fermentação a força da esponja do *cracker* é diminuída, devido às modificações que ocorrem no glúten nesse período. TANILLI (1976), também recomendou o uso de farinha de trigo de glúten forte na fase esponja para suportar o longo tempo de fermentação dessa etapa do processo.

**Tabela 5 - Características farinográficas da farinha de trigo**

<b>Parâmetros</b>	<b>Valor</b>
Absorção de água (%)	56,2
Tempo de chegada (min)	1,0
<b>Tempo de desenvolvimento (min)</b>	2,0
Estabilidade (min)	19,5
Tempo de saída (min)	20,5
Índice de tolerância (UF)	40,0

### **1.3.2. Avaliação das propriedades extensográficas da massa**

Os resultados do extensograma da farinha de trigo estão apresentados na Tabela 6. Foram encontrados altos valores de elasticidade e resistência à extensão das massas. Segundo MAILHOT & PATTON (1988) farinhas de trigo adequadas ao processamento do cracker devem apresentar massas com média extensibilidade e baixa elasticidade ou seja características de glúten de força média a fraca.

A avaliação conjunta dos parâmetros farinográficos e extensográficos da farinha de trigo usada neste trabalho mostrou a necessidade de modificação das características viscoelásticas da massa para a obtenção de *cracker* de boa qualidade. Segundo PYLER (1982) a adição de proteases pode ser usada para se obter a modificação requerida, principalmente com relação à diminuição da elasticidade da massa.

**Tabela 6 – Parâmetros de extensão da farinha de trigo**

<b>Parâmetros</b>	<b>Tempo de descanso(min)</b>		
	<b>45</b>	<b>90</b>	<b>135</b>
Resistência à extensão(UE)	430	670	630
Resistência máxima (UE)	610	860	775
Extensibilidade(mm)	145	122	122

## 2. Efeito da adição de proteases no pH e nas propriedades extensográficas das massas do *cracker*

Neste item serão apresentados e discutidos os valores de pH e das propriedades extensográficas das massas, com e sem adição de proteases, obtidas da fermentação da esponja na produção de *cracker*, nas condições estabelecidas nos ensaios experimentais (T1, T2, T3, T4 e T5).

### 2.1. Efeito no pH

Os resultados do estudo do comportamento do pH das esponjas do *cracker* no processo convencional (T1) e na presença de proteases (T2, T3, T4 e T5), nos diferentes tempos de fermentação, estão apresentados na Tabela 7. Pode ser observado que em todos os tratamentos o pH sofreu pequena redução com o aumento do tempo de fermentação (Figura 9).

**Tabela 7 - Efeito do tempo de fermentação nos valores de pH<sup>1</sup> das esponjas do *cracker*, nas condições estabelecidas nos ensaios experimentais (T1, T2, T3, T4 e T5)**

Tratamentos	Tempo de Fermentação (horas)				
	0	4	8	12	18
Convencional (T1)	5,85	5,53	5,31	4,97	4,54
Fúngica (T2)	5,85	5,77	5,44	5,10	-
Fúngica(T3)	5,85	5,80	5,43	5,07	-
Bacteriana(T4)	5,85	5,80	5,51	5,10	-
Bacteriana(T5)	5,85	5,80	5,53	5,12	-

<sup>1</sup> Médias de três determinações

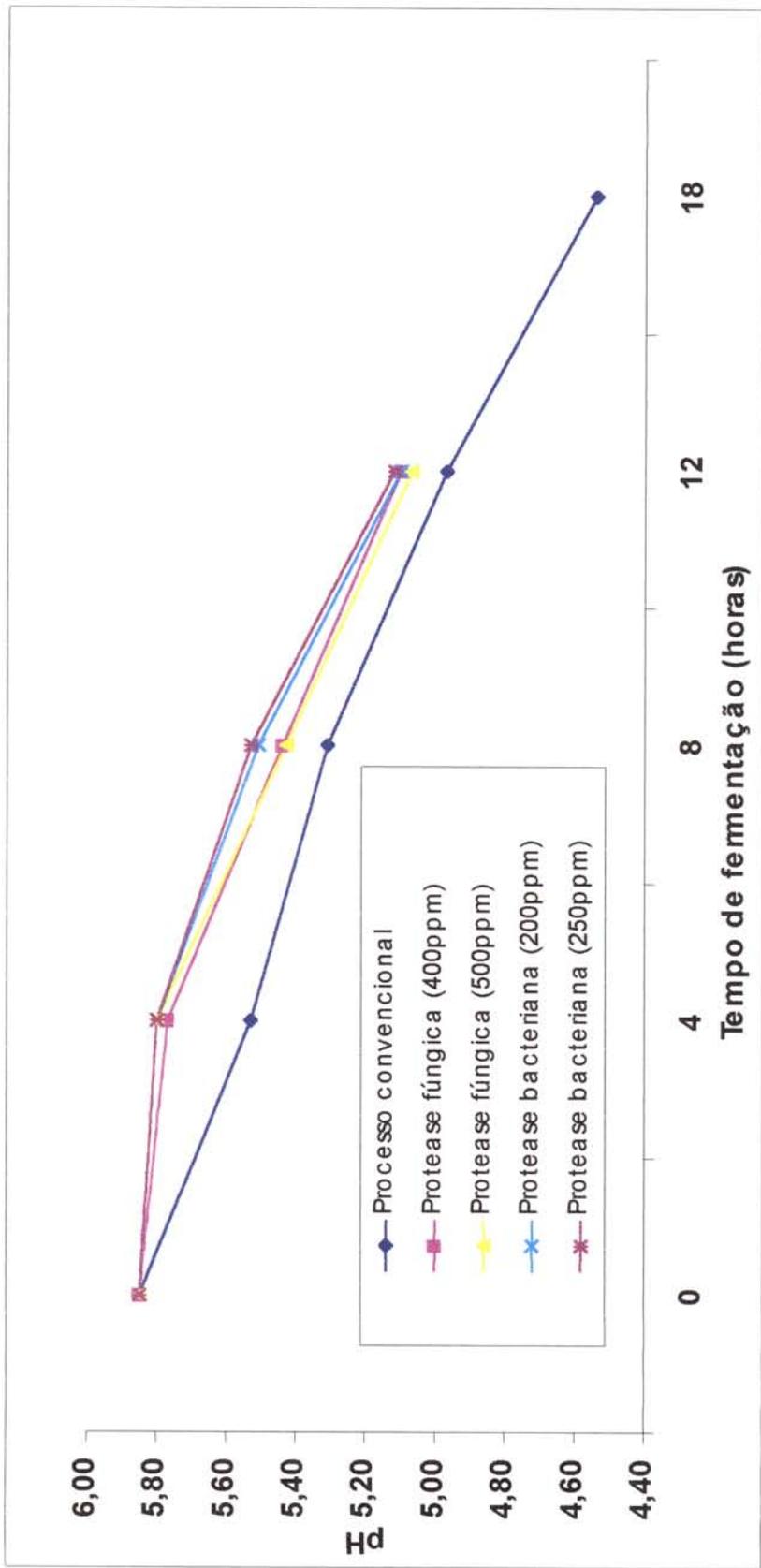


Figura 9 - Efeito da fermentação no pH das esponjas do cracker no processo convencional e na presença de proteases fúngica e bacteriana

Os tratamentos com proteases T2, T3, T4 e T5 apresentaram valores de pH superiores ao do tratamento sem proteases (T1), comparando-se nos mesmos tempos de fermentação (0, 4, 8 e 12 horas). Foi mencionado por WHITELEY (1971) valores de pH inicial da esponja de cerca de 5,5-6,0, sendo, no entanto, recomendado para atividade ótima da levedura valores entre 5,0-5,5, faixa esta que é raramente alcançada durante a fermentação na qual são registrados valores de pH entre 5,5-6,0. No entanto, os resultados encontrados no presente trabalho mostraram que, nos tempos de fermentação de 8 e 12 horas, foram alcançados os valores ótimos para a atividade mencionados por WHITELEY (1971) em todos os tratamentos (T1, T2, T3, T4 e T5), exceto no T1 a 12 horas de fermentação. O mesmo autor acrescentou ainda que, se os valores de pH forem maiores que 6,5 ou 7,0 a velocidade da fermentação pode ser consideravelmente retardada, impedindo que importantes reações bioquímicas ocorram durante o processo fermentativo.

No tratamento T1 (sem adição de proteases), a 18 horas de fermentação foi encontrado o pH de 4,54, valor bem próximo ao mencionado por EL DASH et al. (1982) em processamento convencional de *crackers*.

## **2.2. Efeito nas propriedades extensográficas**

Será primeiramente apresentado o efeito do tempo de fermentação da esponja nas propriedades extensográficas da massa no processo convencional (item 2.2.1). A seguir serão abordados os efeitos das proteases fúngica e bacteriana e do tempo de fermentação da esponja nos processos T2 e T3 (item 2.2.2) e T4 e T5 (item 2.2.3.)

### **2.2.1. Tratamento T1 (Processo convencional)**

Os resultados dos parâmetros extensográficos das massas do *cracker* no processo convencional T1, após a fermentação das esponjas por 0, 4, 8, 12 e 18 horas, estão apresentados na Tabela 8.

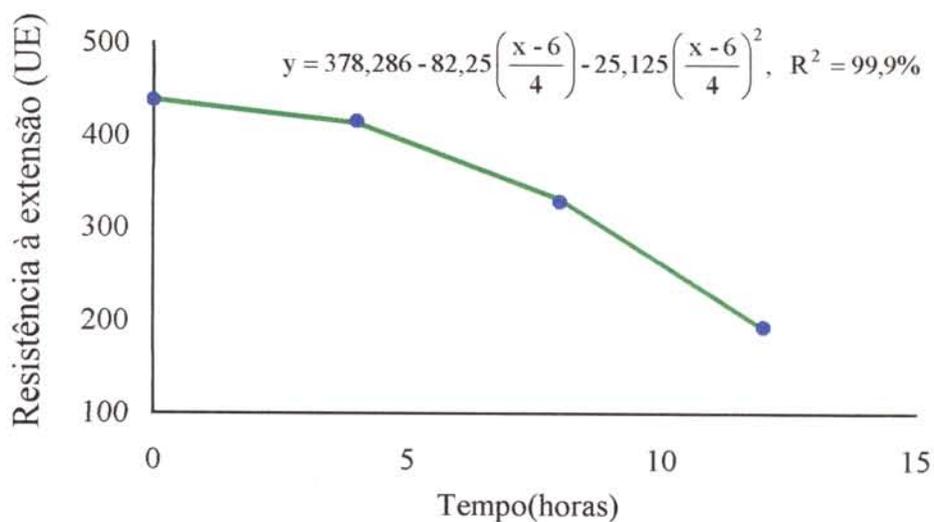
**Tabela 8 - Efeito do tempo de fermentação da esponja nos parâmetros extensográficos da massa do cracker no processo convencional**

Parâmetros	Tempos de fermentação (horas)				
	0	4	8	12	18
Resistência à extensão (UE)	438 <sub>a</sub>	415 <sub>a</sub>	328 <sub>b</sub>	193 <sub>c</sub>	165 <sub>c</sub>
Resistência máxima (UE)	485 <sub>a</sub>	485 <sub>a</sub>	330 <sub>b</sub>	200 <sub>c</sub>	187 <sub>c</sub>
Extensibilidade (mm)	102 <sub>a</sub>	99 <sub>a</sub>	74 <sub>b</sub>	69 <sub>b</sub>	91 <sub>ab</sub>

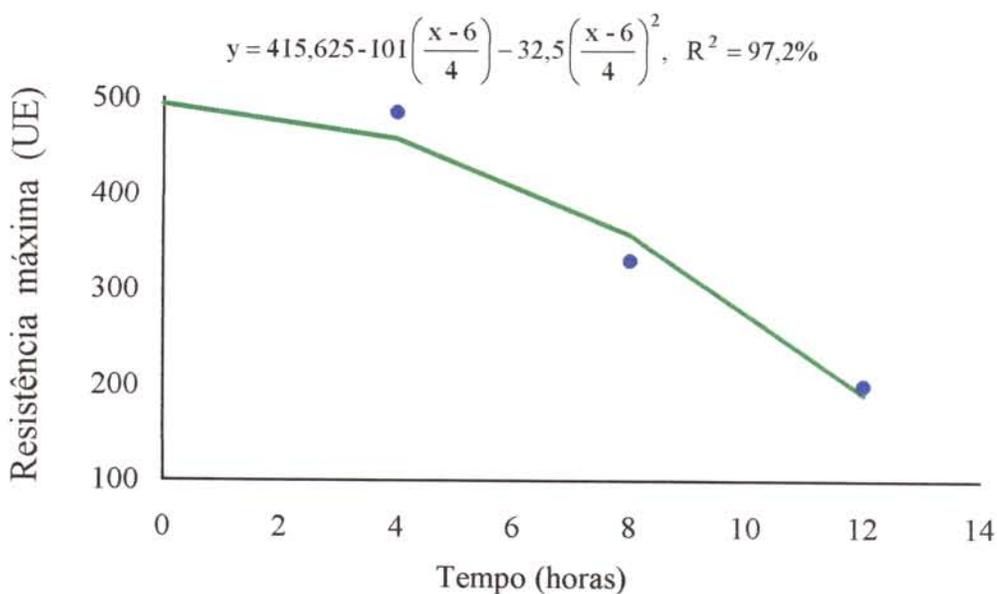
As médias seguidas da mesma letra, nas linhas, são consideradas iguais ao nível de 1% de significância, pelo teste de Tukey

Nos APÊNDICES 1,2 e 3 são apresentadas as análises de variância dos resultados da resistência à extensão, resistência máxima e extensibilidade, respectivamente, nos tempos de fermentação nos tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5.

O efeito do tempo de fermentação da esponja do *cracker* pode ser observado através da queda nos valores de resistência à extensão, resistência máxima e extensibilidade, durante o período de fermentação, conforme mostrado nas Figuras 10, 11 e 12. Resultados similares, com relação as resistências máxima e a extensão, foram obtidos por PIZZINATTO & HOSENEY (1980b). No entanto, no trabalho de WU & HOSENEY (1990) foi relatada queda na elasticidade da massa nas primeiras cinco horas de fermentação da esponja, o que foi observado nesta pesquisa após 8, 12 e 18 horas de fermentação da esponja. Segundo WU & HOSENEY (1990) a referida diminuição se deve à modificação do glúten causada pela quebra de ligações dissulfeto das proteínas.



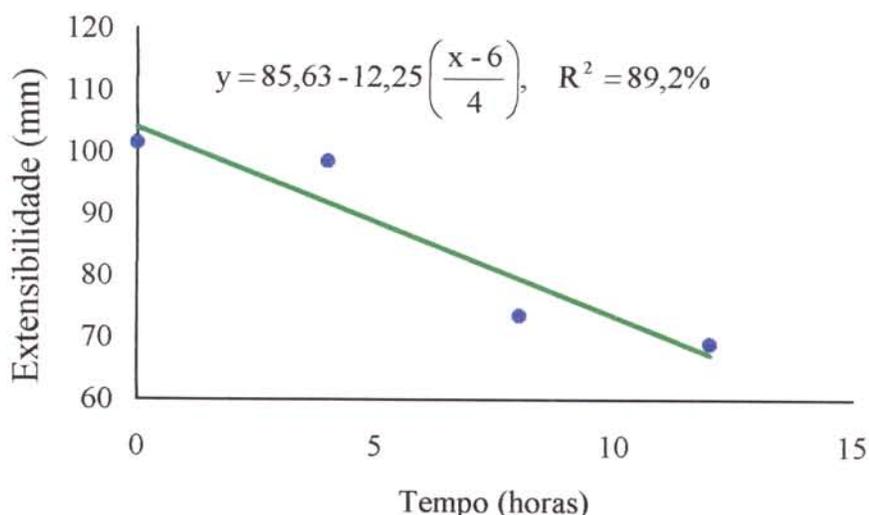
**Figura 10 - Efeito do tempo de fermentação da esponja na resistência à extensão da massa do cracker (processo convencional T1)**



**Figura 11 - Efeito do tempo de fermentação da esponja na resistência máxima da massa do cracker (Processo convencional T1)**

O teste de Tukey mostrou diferença significativa, ao nível de 1%, nos valores dos parâmetros resistência à extensão e resistência máxima, obtidos nos tempos 8 e 12

horas de fermentação, quando comparados aos valores nos tempos 0 e 4 horas, os quais não diferiram entre si (Tabela 8).



**Figura 12- Efeito do tempo de fermentação da esponja na extensibilidade da massa do cracker (Processo convencional T1)**

A diminuição na extensibilidade e no pH das esponjas no processo convencional com o aumento do tempo de fermentação, foi semelhante aos resultados apresentado por DOESCHER & HOSENEY (1985b) que também destacaram o aumento na extensibilidade nas primeiras cinco horas de fermentação da esponja.

A necessidade de maior tempo de fermentação para ocorrer mudanças reológicas na massa do *cracker* encontrados em nosso estudo, poderia ser justificada pela presença de baixo teor de enzimas proteolíticas endógenas na farinha de trigo usada. De acordo com DOESCHER & HOSENEY (1985b) a enzima proteolítica nativa da farinha age com eficácia em longos períodos de fermentação da esponja, quando os valores de pH diminuem a níveis ótimos para sua atividade. Segundo PIZZINATTO & HOSENEY (1980b) as mudanças nas características reológicas da massa foram também decorrentes da ação das proteases.

Tendo em vista estas considerações, os valores de pH da esponja do *cracker* no processo convencional foram relacionados com os valores encontrados nos parâmetros extensográficos da massa, constatando-se uma considerável diminuição nos valores da resistência à extensão e da resistência máxima, ao longo da fermentação, devido, provavelmente, a maior atividade presença de proteases nativas da farinha, com a diminuição do pH da massa.

### **2.2.2. Tratamentos T2 e T3**

A Tabela 9 apresenta os parâmetros extensográficos das massas resultantes de esponjas fermentadas com adição de protease fúngica (tratamento T2 e T3).

Os parâmetros resistência à extensão e resistência máxima nos tratamentos T2 e T3 apresentaram valores máximos de 440 e 485 UE, respectivamente, nas massas não fermentadas e valores mínimos de 145 UE para ambos os parâmetros a 12 horas, período que correspondeu ao tempo final da fermentação da esponja. Estes resultados são comparáveis aos encontrados por ISHIDA & NAGASAKI (1989a) que mostraram diminuição na resistência à extensão da massa de *cracker* quando foi adicionada protease fúngica. Este efeito foi também observado no tratamento T3, no qual a mais alta concentração de protease bacteriana acarretou maiores quedas das resistências, à extensão e máxima, a 4 e 8 horas de fermentação das esponjas.

Em relação ao parâmetro extensibilidade os menores valores foram registrados nos tratamentos T2 e T3, após 4 horas de fermentação, seguido dos de 8 horas.

**Tabela 9 - Efeito da adição de protease fúngica nos parâmetros extensográficos da massa do *cracker* durante a fermentação**

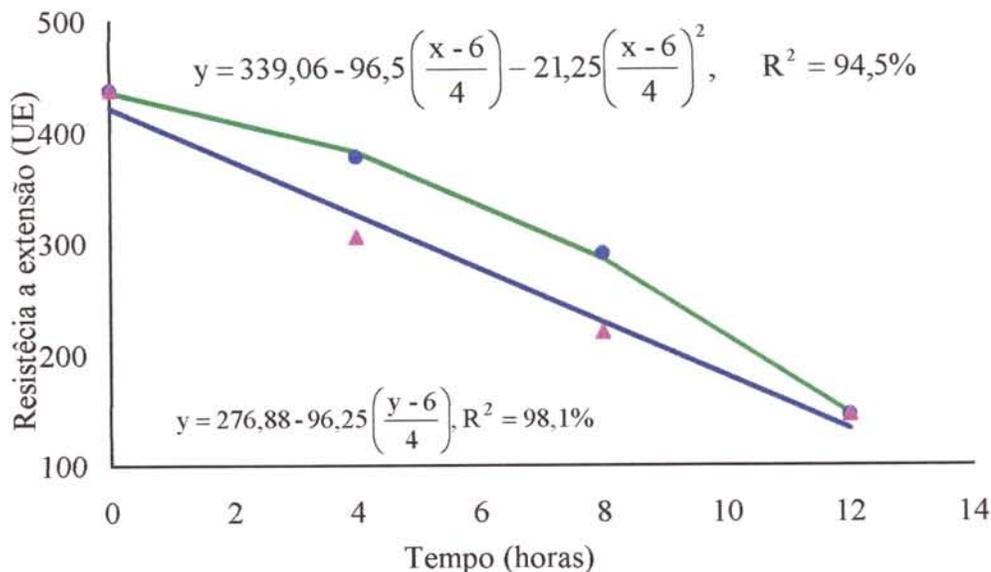
Parâmetros	Tempo de Fermentação (horas)									
	0			4			8			12
	T2	T3	T2	T3	T2	T3	T2	T3	T2	T3
Resistência à extensão (UE)	438 <sub>a</sub>	438 <sub>a</sub>	378 <sub>a</sub>	305 <sub>b</sub>	290 <sub>b</sub>	220 <sub>c</sub>	145 <sub>c</sub>	145 <sub>d</sub>	145 <sub>c</sub>	145 <sub>d</sub>
Resistência máxima (UE)	485 <sub>a</sub>	485 <sub>a</sub>	380 <sub>b</sub>	343 <sub>b</sub>	290 <sub>c</sub>	220 <sub>c</sub>	145 <sub>d</sub>	145 <sub>d</sub>	145 <sub>d</sub>	145 <sub>d</sub>
Extensibilidade (mm)	102 <sub>ab</sub>	102 <sub>a</sub>	88 <sub>b</sub>	84 <sub>c</sub>	95 <sub>ab</sub>	80 <sub>bc</sub>	106 <sub>a</sub>	96 <sub>ab</sub>	106 <sub>a</sub>	96 <sub>ab</sub>

T2: protease fúngica (400ppm)

T3: protease fúngica (500ppm)

Médias seguidas da mesma letra nas linhas, para o tratamento T2 e tratamento T3, são consideradas iguais ao nível de 1% de significância, pelo teste de Tukey

Na Figura 13 pode ser visualizado o efeito da protease fúngica na queda da resistência a extensão da massa do *cracker* (APÊNDICE 1), em função do aumento do tempo de fermentação.

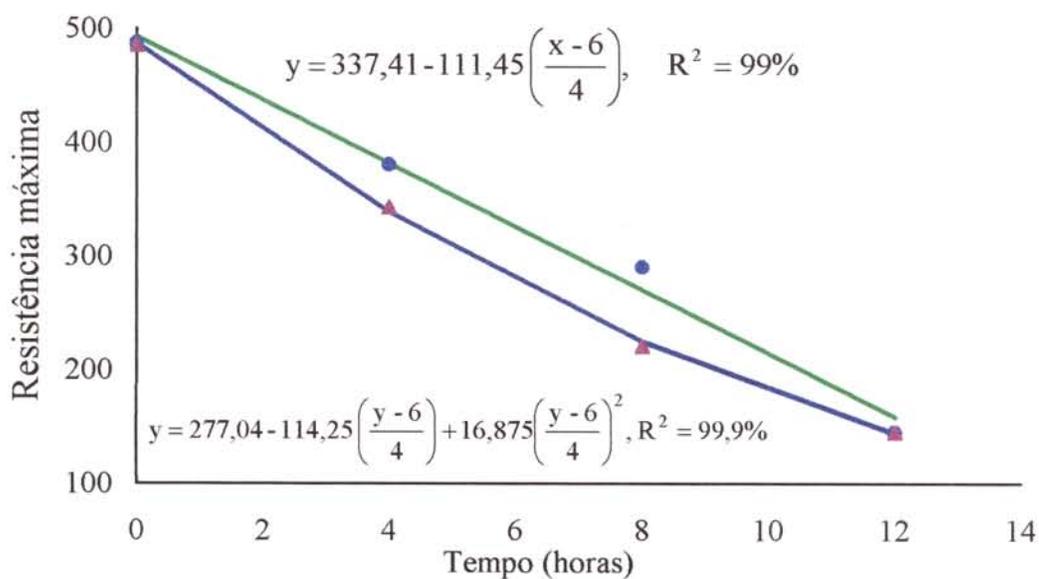


**Figura 13 - Efeito da protease fúngica nas concentrações 400ppm (T2 ●) e 500ppm (T3 ▲) sobre a resistência à extensão das massas do *cracker* durante a fermentação.**

O teste de Tukey aplicado a resistência à extensão no tratamento T2 mostrou que os valores nos tempos 0 e 4 horas de fermentação, foram iguais entre si, porém diferiram dos encontrados nos tempos de 8 e 12 horas, ao nível de 1% de significância, os quais diferiram entre si.

Com aumento da concentração de protease fúngica de 400 para 500 ppm verificou-se uma diferença significativa, ao nível de 1%, nos valores médios obtidos para a resistência à extensão nos tempos de fermentação estudados (0, 4, 8 e 12 horas).

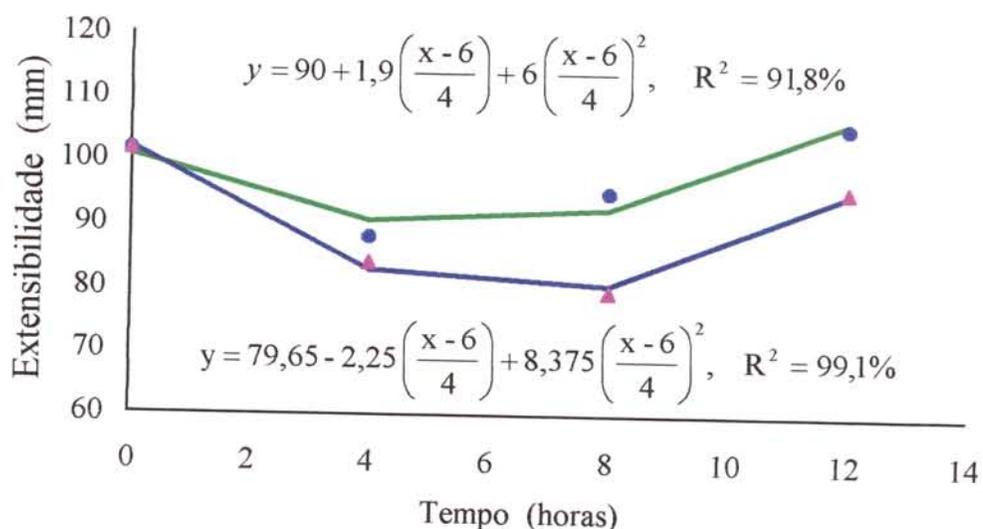
A Figura 14 mostra o efeito da protease fúngica nos tratamentos T2 e T3 na diminuição da resistência máxima da massa (APÊNDICE 2) ao longo da fermentação.



**Figura 14 - Efeito da protease fúngica nas concentrações 400ppm (T2 ●) e 500ppm (T3 ▲) sobre a resistência máxima das massas do *cracker* durante a fermentação**

A análise da resistência máxima nos tratamentos T2 e T3, pelo teste de Tukey, mostrou que os valores obtidos diferiram, ao nível de 1% de significância, em todos os tempos de fermentação estudados. A diminuição dos valores da resistência máxima, nos tempos de 4 e 8 horas foi maior no tratamento T3 em relação ao T2.

Figura 15 mostra o efeito da enzima fúngica (tratamentos T2 e T3) na extensibilidade das massas do *cracker* (APÊNDICE 3) durante a fermentação da esponja.



**Figura 15 - Efeito da protease fúngica nas concentrações 400ppm (T2 ●) e 500ppm (T3 ▲) sobre a extensibilidade das massas do cracker durante a fermentação**

Os valores de extensibilidade obtidos no tratamento T2 não diferiram entre si, ao nível de 1% de significância, nos tempos 0, 4 e 8 horas de fermentação, porém após 12 horas de fermentação verificou-se uma diferença significativa quando comparados ao tempo de 4 horas.

No tratamento T3 verificou-se que os valores de extensibilidade nos tempos 4 e 8 horas não diferiram entre si, porém diferiram no tempo 0, ao nível de 1% de significância. Após 12 horas verificou-se que não houve diferença significativa quando comparados nos tempos 0 e 8 horas.

Conforme mencionado por PETIT & AUDIDIER (1967) o efeito geral da ação das proteases na massa é a redução na força do glúten, de modo que a massa se torna mais extensível e de manuseio mais fácil durante o processamento, fornecendo um produto final de melhor qualidade geral.

Os resultados da extensibilidade nos tratamentos T2 e T3 sofreram pequenas modificações que não permitiram definir uma tendência a medida que o tempo de fermentação aumentou, o que foi observado nos parâmetros resistência à extensão e resistência máxima. No entanto, os resultados obtidos mostraram efeitos benéficos da adição da protease fúngica (tratamentos T2 e T3) nas propriedades viscoelásticas da massa, visto que promoveram, após 12 horas de fermentação da esponja, o enfraquecimento desejável da rede do glúten, resultando em um balanço adequado entre extensibilidade e elasticidade. Segundo BARRET (1975), este efeito permite que as massas possam ser laminadas sem serem rompidas e os *crackers* após o cozimento apresentem superfície lisa, sem bolhas ou deformações.

### **2.2.3. Tratamentos T4 e T5**

Os valores dos parâmetros extensográficos da massa do *cracker*, a partir de esponjas fermentadas com protease bacteriana, estão apresentados na tabela 10.

**Tabela 10 – Efeito da adição de protease bacteriana nos parâmetros extensográficos da massa do *cracker* durante a fermentação**

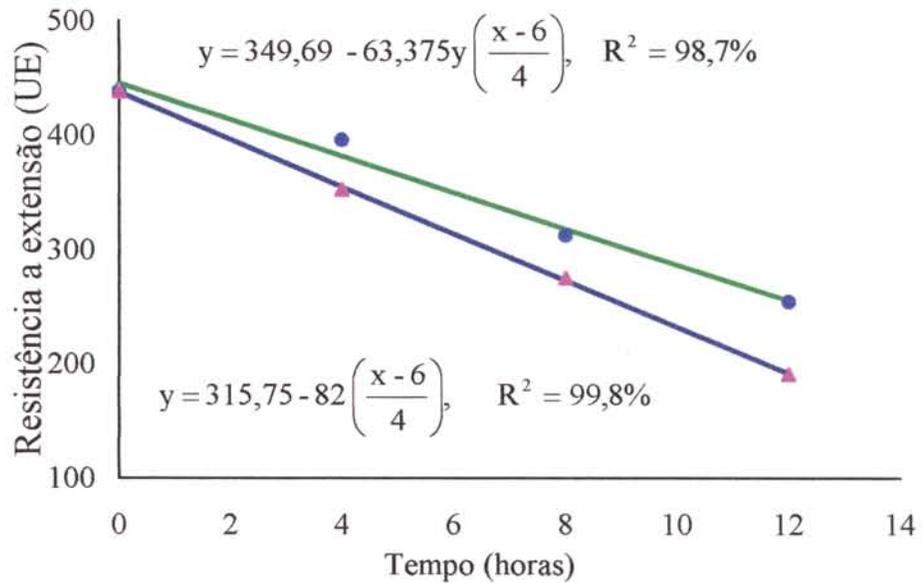
Parâmetros	Tempo de Fermentação (horas)									
	0		4		8		12			
	T4	T5	T4	T5	T4	T5	T4	T5	T4	T5
Resistência à extensão (UE)	438 <sub>a</sub>	438 <sub>a</sub>	395 <sub>ab</sub>	353 <sub>b</sub>	313 <sub>bc</sub>	275 <sub>c</sub>	254 <sub>c</sub>	190 <sub>d</sub>		
Resistência máxima (UE)	485 <sub>a</sub>	485 <sub>a</sub>	410 <sub>b</sub>	373 <sub>b</sub>	318 <sub>c</sub>	280 <sub>c</sub>	255 <sub>d</sub>	198 <sub>d</sub>		
Extensibilidade (mm)	102 <sub>ab</sub>	102 <sub>a</sub>	104 <sub>a</sub>	106 <sub>a</sub>	87 <sub>bc</sub>	103 <sub>a</sub>	83 <sub>d</sub>	103 <sub>a</sub>		

T4: protease bacteriana (200ppm)

T5: protease fúngica (250ppm)

Médias seguidas da mesma letra nas linhas, para o tratamento T4 e o tratamento T5, são consideradas iguais pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de significância

Na figura 16 pode-se avaliar o efeito da protease bacteriana nos tratamentos T4 e T5 na diminuição gradativa da resistência à extensão da massa (APÊNDICE 1) nos tempos de fermentação estudados (0, 4, 8 e 12 horas)

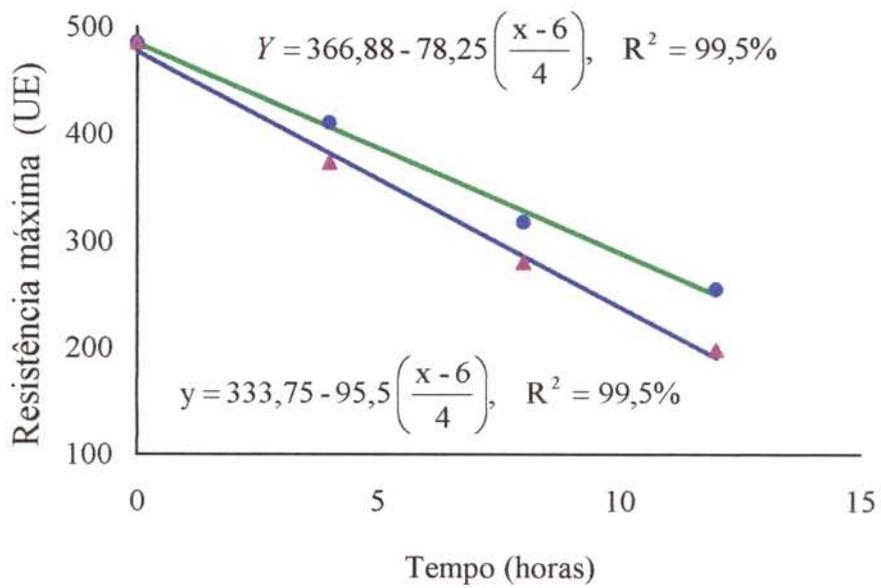


**Figura 16 - Efeito da protease bacteriana nas concentrações 200ppm (T4 ●) e 250ppm (T5 ▲) sobre a resistência à extensão das massas do cracker durante a fermentação**

A análise, pelo teste de Tukey, dos resultados da resistência à extensão no tratamento T4 mostrou que os valores obtidos nos tempos 0 e 4 horas de fermentação não diferiram entre si, ao nível de 1% de significância. O mesmo comportamento foi observado entre os tempos 4 e 8 horas e 8 e 12 horas.

No tratamento T5, constatou-se, pelo teste de Tukey, que os valores obtidos nos tempos 0, 4, 8 e 12 horas de fermentação diferiram entre si, ao nível de 1% de significância.

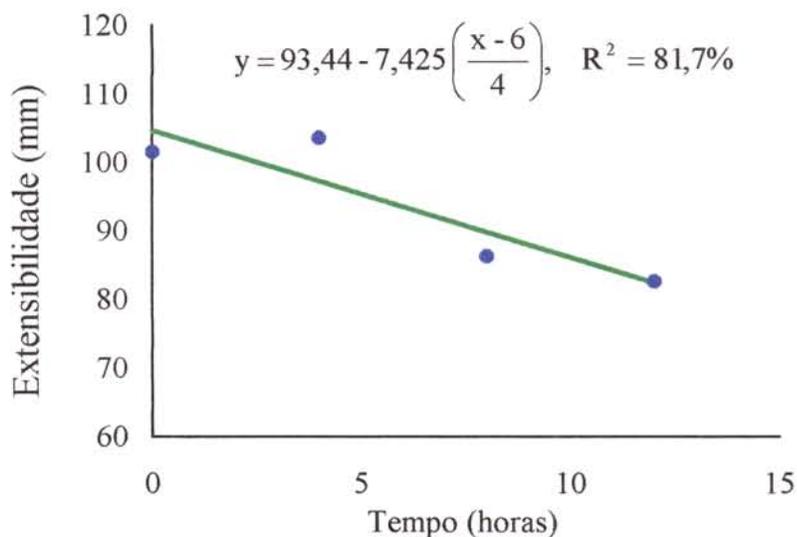
A Figura 17 mostra o comportamento da resistência máxima da massa do *cracker* (APÊNDICE 2) na presença de protease bacteriana (tratamento T4 e T5) durante o período de fermentação.



**Figura 17 - Efeito da protease bacteriana nas concentrações 200ppm (T4 ●) e 250ppm (T5 ▲) sobre a resistência máxima das massas do *cracker* durante a fermentação**

Os valores encontrados para resistência máxima, em todos os tempos estudados, diferiram entre si, ao nível de 1% de significância, nos tratamentos T4 e T5, pelo teste de Tukey.

A extensibilidade da massa do *cracker* (APÊNDICE 3) no tratamento T4, durante o período de fermentação é visualizada na Figura 18.



**Figura 18 - Efeito da protease bacteriana na concentração 200ppm (T4 ●) sobre a extensibilidade massa do *cracker* durante a fermentação**

No tratamento T4, o teste de Tukey não mostrou diferença significativa, ao nível de 1%, entre os valores de extensibilidade nos tempos 0 e 4 horas. Entretanto, estes valores diferiram dos encontrados em 8 e 12 horas de fermentação. No tratamento T5, o teste de Tukey confirmou que não existe diferença significativa, ao nível de 1%, entre os valores de extensibilidade nos tempos estudados (0, 4, 8 e 12 horas), portanto, não houve efeito de tratamento.

Analisando os resultados, verificou-se que a maior concentração de protease bacteriana permitiu diminuição mais acentuada nos valores das resistências, à extensão e máxima, da massa do *cracker*. Ao contrário, a extensibilidade sofreu pequena variação após 4 e 8 horas de fermentação, na menor concentração da enzima bacteriana usada. Isto permitiu mostrar a ação eficaz dessa protease sobre a força da esponja, cujo efeito torna a estrutura do glúten da massa menos elástica. Segundo MONNIER & GODON (1975) farinhas para biscoitos devem apresentar estrutura de glúten menos elástica e mais extensível, para evitar ou minimizar o problema de aglomeração das proteínas e o endurecimento excessivo do produto final.

### 2.3. Estudo comparativo dos tratamentos (T1, T2, T3, T4 e T5) através dos parâmetros extensográficos das massas durante a fermentação da esponja

Os itens 2.3.1, 2.3.2, 2.3.3 e 2.3.4 mostram os resultados do estudo estatístico comparativo entre os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5 visando evidenciar o efeito das proteases, fúngica e bacteriana, nos parâmetros extensográficos da massa nos tempos de 4, 8 e 12 horas de fermentação da esponja no processo de produção de *crackers*.

No item 2.3.4. foram comparados estatisticamente os resultados dos parâmetros extensográficos nos tratamentos T2, T3, T4 e T5 após 12 horas de fermentação com os obtidos no processo convencional após 18 horas de fermentação.

#### 2.3.1. Resistência à extensão

A tabela 11 mostra os valores médios da resistência à extensão nos tempos 0, 4, 8 e 12 horas de fermentação nos tratamentos realizados (T1, T2, T3, T4 e T5), os quais foram comparados pelo teste de Tukey.

**Tabela 11 - Médias da resistência à extensão <sup>1,2</sup> (RE) da massa do cracker sem e com adição de proteases fúngica ou bacteriana**

Tratamento	Tempo de fermentação (horas)			
	0	4	8	12
Convencional (T1)	438 <sub>a</sub>	415 <sub>a</sub>	328 <sub>a</sub>	193 <sub>ab</sub>
Fúngica (T2)	438 <sub>a</sub>	378 <sub>a</sub>	290 <sub>a</sub>	145 <sub>b</sub>
Fúngica (T3)	438 <sub>a</sub>	305 <sub>b</sub>	220 <sub>b</sub>	145 <sub>b</sub>
Bacteriana (T4)	438 <sub>a</sub>	395 <sub>a</sub>	313 <sub>a</sub>	254 <sub>a</sub>
Bacteriana (T5)	438 <sub>a</sub>	353 <sub>ab</sub>	275 <sub>ab</sub>	190 <sub>b</sub>

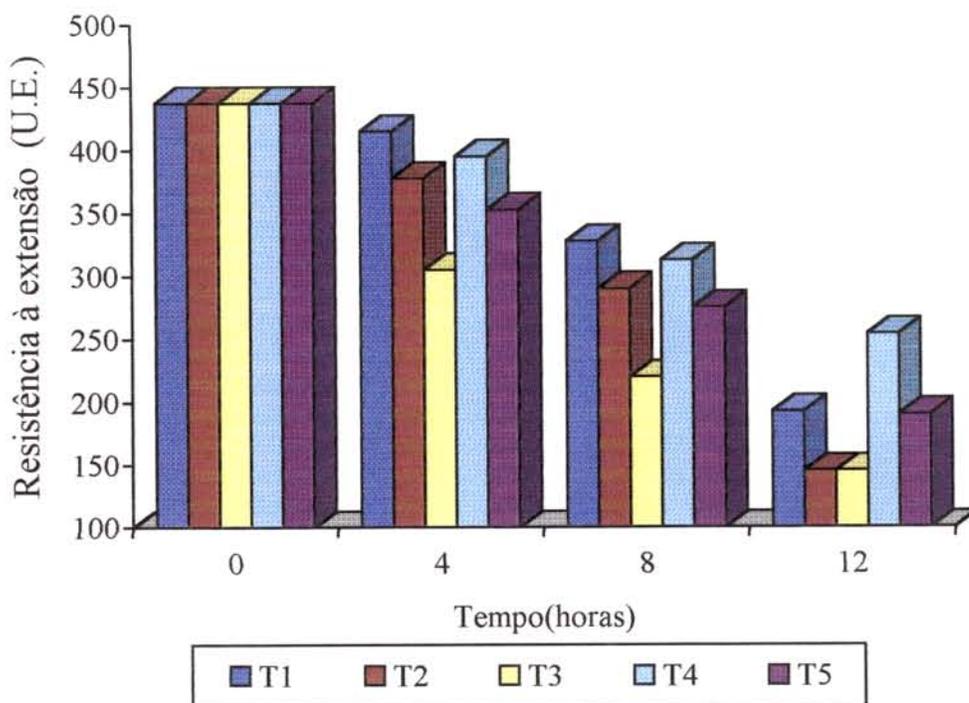
1 Média de quatro determinações

2 Médias seguidas da mesma letra nas colunas, são consideradas iguais pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de significância

Os tratamentos com protease fúngica (T3) e protease bacteriana (T5) nos tempos de fermentação de 0, 4, 8 e 12 horas não diferiram estatisticamente, ao nível de 1% de significância, com relação a resistência a extensão da massa do *cracker*. Os efeitos causados na massa nestes tratamentos pela ação das proteases foram maiores no período de 4 a 12 horas de fermentação. Após 12 horas de fermentação, em ambos os tratamentos (T3 e T5), ocorreu uma acentuada diminuição nos valores de resistência a extensão que tornaram a massa extremamente mole e sem condições de manuseio. Por esta razão o processamento do biscoito *cracker* em laboratório foi realizado nos tratamentos T3 e T5, usando no máximo 12 horas de fermentação da esponja.

Verificou-se que com 4 e 8 horas de fermentação houve diferença significativa na resistência a extensão, ao nível de 1%, entre o tratamento T2 e T3, os quais após 12 horas apresentaram valores médios iguais (145,00UE). Comparando-se os tratamentos T4 e T5, verificou-se que os valores de R E após 4 e 8 horas de fermentação não apresentaram diferença significativa, ao nível de 1%, o mesmo não ocorrendo com 12 horas de fermentação.

A Figura 19 apresenta a variação da resistência a extensão da massa do *cracker*, em função do período de fermentação nos tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5, mostrando a maior ação hidrolítica das proteases fúngica e bacteriana nos tratamentos T3 e T5, que acarretaram maiores quedas na RE, após período de 4 a 8 horas de fermentação em relação aos demais tratamentos estudados. Em cada tempo de fermentação (4, 8 e 12 horas), a diminuição da resistência a extensão foi maior no tratamento T3 em relação ao T5.



T1-Convençional

T2-Protease fúngica, 400ppm

T3-Protease fúngica, 500 ppm

T4-Protease bacteriana, 200 ppm

T5-Protease bacteriana, 250 ppm

**Figura 19 - Comportamento da resistência à extensão da massa do cracker ao longo da fermentação, nos tratamentos estudados.**

### 2.3.2. Resistência máxima

Os resultados da resistência máxima das massas do *cracker*, durante a fermentação nos tratamentos (T1, T2, T4 e T5) estão apresentados na tabela 12.

**Tabela 12 - Médias da resistência máxima <sup>1,2</sup> da massa do *cracker* sem e com adição de proteases fúngica ou bacteriana**

Tratamento	Tempo de fermentação (horas)			
	0	4	8	12
Convencional (T1)	485 <sub>a</sub>	485 <sub>a</sub>	330 <sub>a</sub>	200 <sub>ab</sub>
Fúngica (T2)	485 <sub>a</sub>	380 <sub>bc</sub>	290 <sub>a</sub>	145 <sub>b</sub>
Fúngica (T3)	485 <sub>a</sub>	343 <sub>c</sub>	220 <sub>b</sub>	145 <sub>b</sub>
Bacteriana (T4)	485 <sub>a</sub>	410 <sub>b</sub>	318 <sub>a</sub>	255 <sub>a</sub>
Bacteriana (T5)	485 <sub>a</sub>	373 <sub>bc</sub>	280 <sub>ab</sub>	198 <sub>ab</sub>

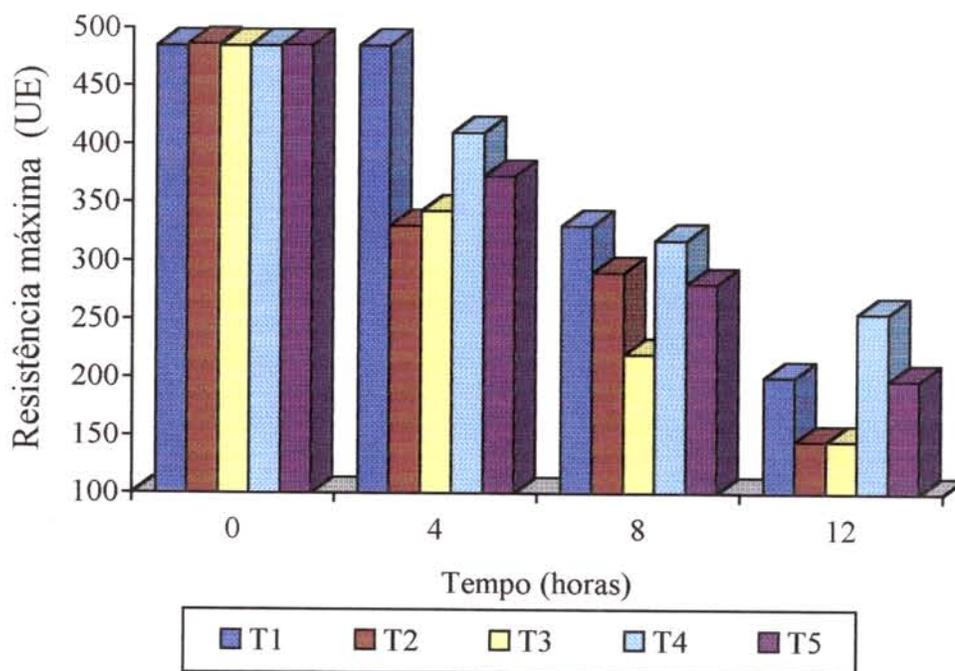
1 Média de quatro determinações;

2 Médias seguidas da mesma letra nas colunas são consideradas iguais, pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de significância

Os valores de resistência máxima nos tratamentos T2 e T3, pelo teste de Tukey, diferiram entre si ao nível de 1%, nos tempos de fermentação de 8 horas, enquanto que os tratamentos T4 e T5 não apresentaram diferença significativa nos tempos 4 e 8 horas. No tempo de 12 horas de fermentação não foi observado diferença significativa, ao nível de 1%, entre os tratamentos T2 e T3, e os tratamentos T4 e T5.

Na Figura 20 observa-se que a resistência máxima da massa do *cracker*, para cada tratamento, apresentou comportamento similar durante o período de fermentação estudado, ocorrendo diminuição gradual dos valores médios obtidos com o aumento do tempo de fermentação. A elasticidade da massa diminuiu consideravelmente e de forma mais acentuada, quando a massa do *cracker* foi tratada com proteases, notadamente nos tratamentos T2 e T3, com adição de enzima fúngica.

Os valores médios da resistência máxima, nos tratamentos T2, T3 e T5, foram estatisticamente iguais nos tempos de fermentação estudados, exceto no tempo de 8 horas, mostrando uma ação hidrolítica maior da enzima fúngica no tratamento T3 em relação a bacteriana no tratamento T5.



T1-Convencional

T2-Protease fúngica, 400ppm

T3-Protease fúngica, 500 ppm

T4-Protease bacteriana, 200 ppm

T5-Protease bacteriana, 250 ppm

**Figura 20 - Comportamento da resistência máxima da massa do cracker nos tratamentos estudados.**

### 2.3.3. Extensibilidade

A Tabela 13 indica os valores médios obtidos para extensibilidade da massa *cracker* durante a fermentação nos tratamentos estudados.

**Tabela 13 – Médias da extensibilidade <sup>1</sup> da massa do cracker sem e com adição de proteases fúngica ou bacteriana**

Tratamento	Tempo de fermentação (horas)			
	0	4	8	12
Convencional (T1)	102 <sub>a</sub>	99 <sub>ab</sub>	74 <sub>c</sub>	69 <sub>c</sub>
Fúngica (T2)	102 <sub>a</sub>	88 <sub>cb</sub>	95 <sub>ab</sub>	106 <sub>a</sub>
Fúngica (T3)	102 <sub>a</sub>	84 <sub>c</sub>	80 <sub>c</sub>	96 <sub>ab</sub>
Bacteriana (T4)	102 <sub>a</sub>	104 <sub>ab</sub>	86 <sub>cb</sub>	83 <sub>bc</sub>
Bacteriana (T5)	102 <sub>a</sub>	106 <sub>a</sub>	103 <sub>a</sub>	105 <sub>a</sub>

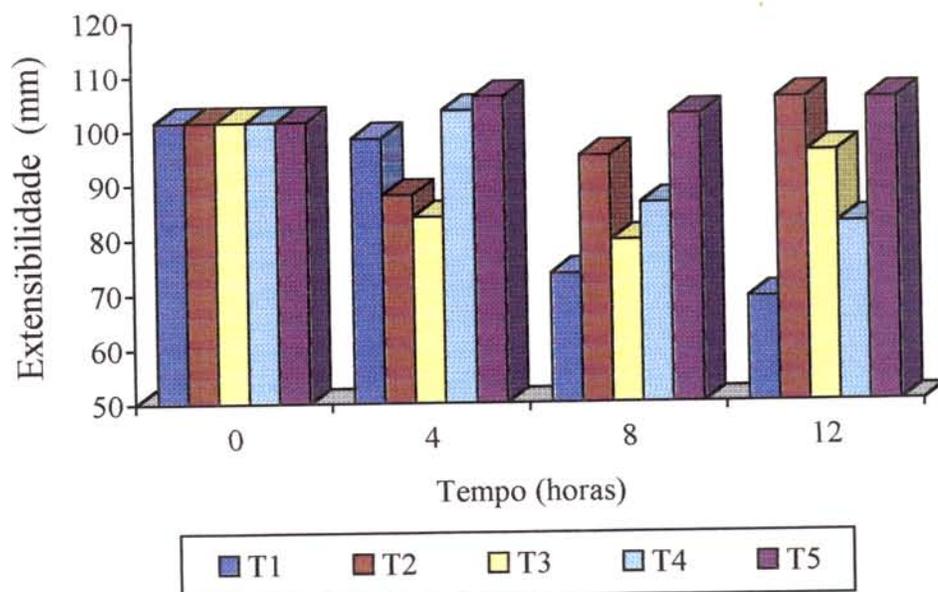
<sup>1</sup> Média de quatro determinações;

Médias seguidas da mesma letra nas colunas são consideradas iguais pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de significância

Os valores de extensibilidade obtidos nos tratamentos T2 e T3, nos tempos de 0, 4 e 12 horas de fermentação, não diferiram entre si ao nível de 1% de significância, pelo teste de Tukey.

Com o aumento da concentração de protease bacteriana de 200 para 250ppm, nos tratamentos T4 e T5, respectivamente, verificou-se que as médias da extensibilidade da massa não diferiram entre si, ao nível de 1% de significância, no tempo de fermentação de 4 horas, porém nos tempos 8 e 12 horas mostraram-se diferentes estatisticamente, sendo maiores os valores da extensibilidade no tratamento T5.

A Figura 21 apresenta a variação da extensibilidade da massa durante a fermentação em todos os tratamentos, podendo-se visualizar em T1 a extensibilidade diminuindo gradualmente ao longo da fermentação. Esta redução foi também observada no tratamento T4, porém de forma menos acentuada, enquanto em T5 verificou-se um ligeiro aumento na extensibilidade no decorrer da fermentação.



T1-Convençional  
 T2-Protease fúngica, 400ppm  
 T3-Protease fúngica, 500 ppm  
 T4-Protease bacteriana, 200 ppm  
 T5-Protease bacteriana, 250 ppm

**Figura 21 - Comportamento da extensibilidade da massa do cracker no período de fermentação nos tratamentos estudados**

#### 2.3.4. Estudo comparativo dos parâmetros extensográficos das massas nos tratamentos T2, T3, T4 e T5 (após 12 horas de fermentação da esponja) e do processamento convencional (T1) após 18 horas de fermentação

Através do teste de Tukey foi feito um estudo comparativo dos efeitos, nas propriedades extensográficas, causados pela ação das proteases, fúngica e bacteriana, (tratamentos T1, T2, T3 e T4) na esponja do *cracker* após 12 horas de fermentação, em relação ao processo convencional (tratamento T1) sem adição de enzimas após 18 horas de fermentação, conforme apresentado na tabela 14.

**Tabela 14 – Médias dos parâmetros reológicos <sup>1,2</sup> da massa do cracker, nos tratamentos T2, T3, T4, T5 (após 12 horas de fermentação da esponja) e T1 (18 horas de fermentação da esponja)**

<b>Tratamento</b>	<b>Resistência a extensão(UE)</b>	<b>Resistência Máxima(UE)</b>	<b>Extensibilidade (mm)</b>
Convencional -T1 (18 horas)	165 <sub>b</sub>	187 <sub>bc</sub>	91 <sub>ab</sub>
Fúngica -T2 (12 horas)	145 <sub>b</sub>	145 <sub>c</sub>	106 <sub>a</sub>
Fúngica -T3 (12 horas)	145 <sub>b</sub>	145 <sub>c</sub>	96 <sub>ab</sub>
Bacteriana -T4 (12 horas)	254 <sub>a</sub>	255 <sub>a</sub>	83 <sub>ab</sub>
Bacteriana -T5 (12 horas)	190 <sub>ab</sub>	198 <sub>bc</sub>	105 <sub>a</sub>

<sup>1</sup> Média de quatro determinações;

<sup>2</sup> Médias seguidas da mesma letra nas colunas são consideradas iguais pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de significância

Os resultados mostraram que os valores médios obtidos para os três parâmetros analisados, resistências, à extensão e máxima, e extensibilidade, não apresentaram diferenças significativas, ao nível de 1%, pelo teste de Tukey, quando os tratamentos com protease fúngica (400ppm, T2), (500ppm, T3) e protease bacteriana (250ppm, T5) foram comparados ao processo convencional (T1), sem enzimas. Entretanto, no tratamento com protease bacteriana (200ppm, T4), os valores dos parâmetros das resistências à extensão e máxima, apresentaram diferenças significativas ao nível de 1%.

Desta forma, a fermentação por 12 horas produziu alterações nas propriedades viscoelásticas das massas, nos tratamentos T2, T3 e T5, iguais aquelas que ocorrem na massa sem adição de enzimas (T1), fermentada por 18 horas. Esta modificação introduzida pela presença das enzimas permitiu a redução de 33,3% (6 horas) do tempo de fermentação da esponja no processo convencional (T1) mantendo-se as características extensográficas da massa do *cracker*. Com relação ao tempo de fermentação da massa (6 horas), preparada com a esponja fermentada, obteve-se uma diminuição de 50% (3 horas), promovendo, desta maneira, uma redução de 37,5% (9 horas) do tempo total de fermentação do processo convencional de produção de *crackers* (24 horas).

### 3. Efeito da adição de proteases, fúngica ou bacteriana, nas condições estabelecidas nos ensaios, na solubilidade, viscosidade e perfis eletroforéticos das proteínas das massas do *cracker*

O efeitos da adição de proteases, fúngica ou bacteriana, sobre as proteínas do glúten da massa foram estudados através da solubilidade, viscosidade e perfis eletroforéticos das proteínas. Os resultados foram avaliados em relação as mudanças causadas durante o período de fermentação da esponja do *cracker* sem adição de proteases (processo convencional).

#### 3.1. Efeito da adição de proteases, fúngica ou bacteriana, na solubilidade das proteínas das massas do *cracker*

A tabela 15 mostra os percentuais de nitrogênio extraído das massas dos *crackers*, sem e com adição de protease, na fração solúvel com SDS.

**Tabela 15 – Efeitos dos tratamentos e tempos de fermentação da esponja nas solubilidades das proteínas em SDS (dodecil sulfato de sódio)**

Tratamentos	Nitrogênio extraído da fração solúvel <sup>1</sup> (%)	Índice de solubilidade do Nitrogênio (ISN) <sup>2</sup> (%)
Convencional (T1)		
Sem fermentação	0,6596	34,90 <sub>d</sub>
12 horas	0,6835	36,16 <sub>cd</sub>
18 horas	0,7128	37,71 <sub>c</sub>
Protease fúngica (T3)		
12 horas	0,8252	43,66 <sub>a</sub>
Protease bacteriana (T5)		
12 horas	0,7699	40,73 <sub>b</sub>

1 Média de seis determinações

2 Médias seguidas da mesma letra são consideradas iguais pelo teste de Tukey ao nível de 1% de significância

A solubilidade da proteína expressa em percentagem como um índice de solubilidade do nitrogênio (ISN), foi determinada pela dosagem de nitrogênio na fração

solúvel, nos tratamentos estudados, em relação ao nitrogênio total (1.89%) contido na massa do *cracker*.

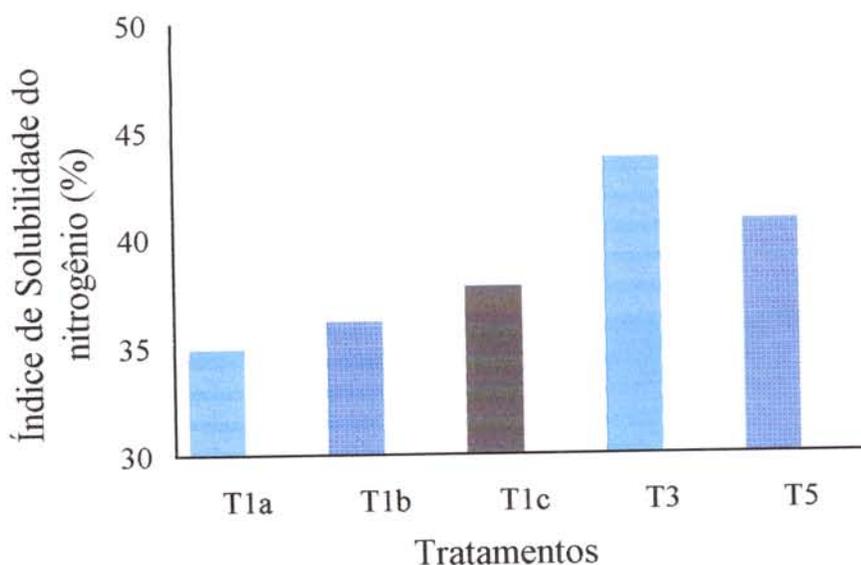
Os valores da solubilidade das proteínas em SDS, das massas dos *crackers* encontram-se relacionados na Tabela 15. A percentagem de nitrogênio extraído da fração solúvel contendo SDS das massas dos *crackers* aumentou após os tempos de fermentação, em todos os tratamentos. A esponja não fermentada apresentou um Índice de solubilidade nitrogênio (ISN) de 34,90% em relação ao nitrogênio total da massa. Porém após 12 e 18 horas de fermentação foram obtidos percentuais de 36,16% e 37,71%, mostrando aumento na solubilidade da proteína causada pela fermentação. Resultados similares foram citados por FARIDI & JOHNSON (1978) que afirmaram que a fermentação é requerida para transformar as propriedades físico-químicas da massa responsáveis pela textura, sabor dos biscoitos, resultantes principalmente da degradação da proteína.

As esponjas com adição de proteases fúngica ou bacteriana, apresentaram um Índice de solubilidade de nitrogênio (ISN) de 43,66% e 40,73%, respectivamente, após 12 horas de fermentação.

Foi verificado o efeito dos tratamentos estudados (APÊNDICE 4) na solubilidade da proteína. Os resultados obtidos foram comparados pelo teste de Tukey (Tabela 15). Os extratos protéicos das massas, em SDS, contendo proteases fúngica ou bacteriana, após 12 horas de fermentação das esponjas, apresentaram maiores valores de solubilidade (ISN) quando comparados com os da esponja, sem adição de proteases, após 12 e 18 horas de fermentação (processo convencional), os quais não diferiram entre si, porém, diferiram dos valores obtidos dos extratos com proteases ao nível de 1% de significância. O extrato obtido de (T3) (12 horas de fermentação) apresentou maior valor de solubilidade (ISN) em relação ao (T5) (12 horas de fermentação), diferindo, entre si ao nível de 1% de significância, pelo teste de Tukey.

Os resultados mostraram claramente, o efeito da adição de proteases na esponja e no aumento do conteúdo de proteínas solúveis. Acredita-se que uma função de grande importancia das proteases na massa do *cracker* é a degradação do glúten, que em valores baixos de pH quebram as ligações peptídicas durante a fermentação.

A Figura 22 ilustra as solubilidades das proteínas em SDS nos tratamentos sem e com adição de proteases, constatando-se os efeitos do tempo de fermentação e do tratamento.



- T1a-Convencional, 0 horas
- T1b-Convencional, 12 horas
- T1c-Convencional, 18 horas
- T3-Fúngica 500 ppm, 12 horas
- T5-Bacteriana 250 ppm, 12 horas

**Figura 22 - Solubilidade das proteínas das massas do cracker, sem e com adição de proteases**

### 3.2. Efeito da adição de proteases, fúngica ou bacteriana na viscosidade dos extratos de proteínas da massa do cracker

#### 3.2.1. Processo convencional

Os resultados da tabela 16 mostram o efeito do tempo de fermentação da esponja do *cracker*, sem adição de protease, na viscosidade dos extratos de proteínas.

**Tabela 16 - Efeito do tempo de fermentação da esponja na viscosidade aparente do extrato de proteína, no processo convencional**

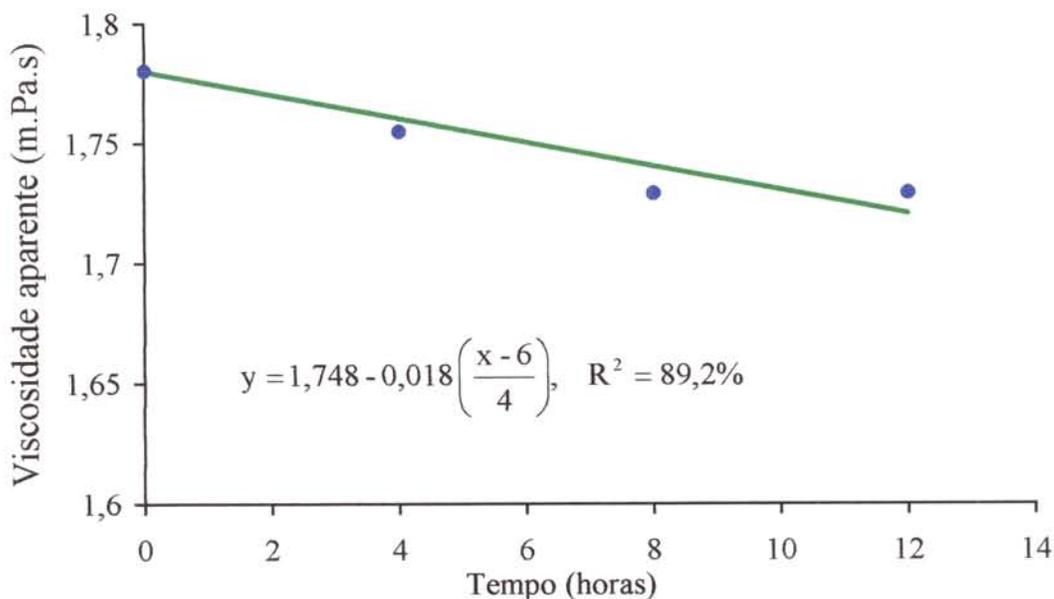
Tempo de fermentação (horas)	Viscosidade aparente (mPa.s)
0	1,7802 <sub>a</sub>
4	1,7544 <sub>a</sub>
8	1,7286 <sub>a</sub>
12	1,7286 <sub>a</sub>
18	1,6512 <sub>b</sub>

Médias seguidas da mesma letra são consideradas iguais pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância

A viscosidade aparente dos extratos protéicos, diminuiu ao longo do tempo de fermentação, sendo maior na massa não fermentada, que na massa após 18 horas de fermentação, conforme indicado na Tabela 16. De acordo com DANNO & HOSENEY (1982b) estes resultados suportam a teoria de que algumas ligações dissulfeto das proteínas do trigo são quebradas ao longo da fermentação, causando modificações nessas proteínas.

O teste de Tukey mostrou que os valores médios obtidos nos tempos 0, 4, 8 e 12 horas de fermentação não diferiram entre si ao nível de 5% de significância, porém significativamente do valor obtido após 18 horas de fermentação.

A figura 23 mostra a diminuição da viscosidade aparente dos extratos protéicos com o aumento do tempo de fermentação da esponja do *cracker* sem adição de proteases.



**Figura 23 - Efeito do tempo de fermentação da esponja na viscosidade aparente do extrato de proteína no processo convencional**

### 3.2.2. Processo com adição de proteases fúngica ou bacteriana

A tabela 17 apresenta os efeitos do tempo de fermentação na esponja do *cracker*, nos tratamentos com adição de proteases, fúngica ou bacteriana e na viscosidade dos extratos protéicos da massa do *cracker*

**Tabela 17 - Efeito da adição de proteases fúngica ou bacteriana, na viscosidade dos extratos de proteínas da massa durante a fermentação**

Tratamentos	Tempo de fermentação (horas)			
	0	4	8	12
Fúngica (T2)	1,7802 <sub>a</sub>	1,7544 <sub>a</sub>	1,7028 <sub>b</sub>	1,7028 <sub>b</sub>
Fúngica (T3)	1,7802 <sub>a</sub>	1,7415 <sub>ab</sub>	1,7028 <sub>bc</sub>	1,6777 <sub>c</sub>
Bacteriana (T4)	1,7802 <sub>a</sub>	1,7286 <sub>b</sub>	1,7028 <sub>b</sub>	1,6512 <sub>c</sub>
Bacteriana (T5)	1,7802 <sub>a</sub>	1,6770 <sub>b</sub>	1,6512 <sub>b</sub>	1,5480 <sub>c</sub>

Médias seguidas da mesma letra nas linhas são consideradas iguais pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância

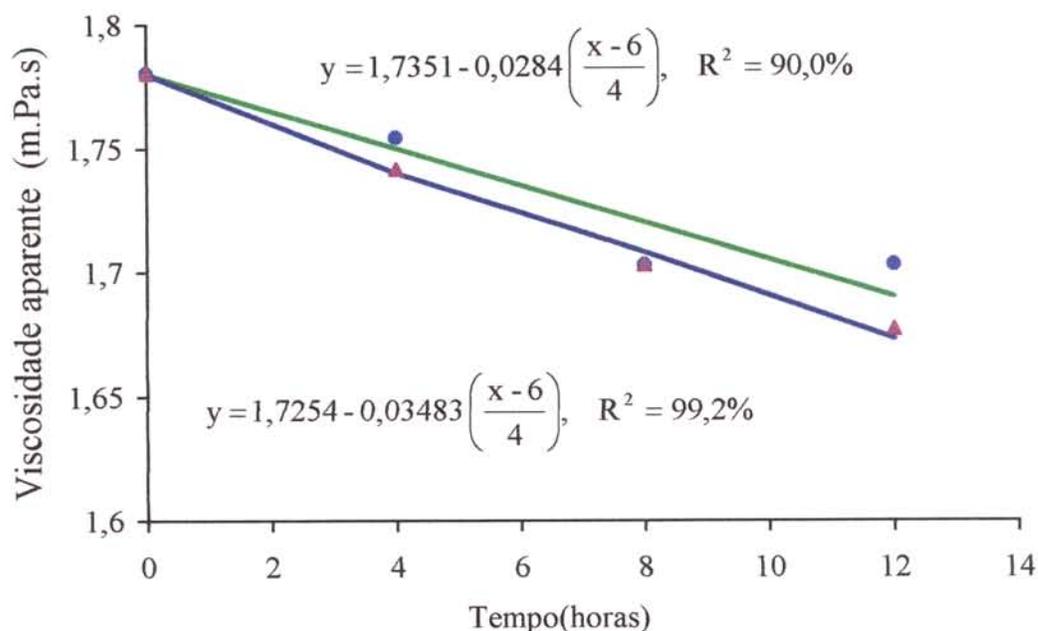
Na tabela 17 pode-se observar, através dos valores médios obtidos, mudanças na viscosidade dos extratos de proteínas, durante a fermentação em todos os tratamentos com proteases (T2, T3, T4 e T5), o que indica que a cadeia peptídica foi alterada durante a fermentação. Segundo WU & HOSENEY (1990) as proteases interferem nas proteínas proporcionando maior solubilidade e menor elasticidade, modificações estas resultantes da quebra de ligações dissulfeto de proteínas. Os mesmos autores acreditam também que uma substância redutora é produzida no início da fermentação da esponja do *cracker*. Entretanto, DANNO & HOSENEY (1982b) observaram que após cinco horas de fermentação a viscosidade inicial dos extratos de proteína diminuiu muito pouco, mostrando o efeito desprezível da protease na viscosidade da proteína.

O teste de Tukey aplicado no tratamento T2 mostrou que os valores obtidos nos tempos 0 e 4 horas não diferiram entre si, ao nível de 5% de significância, porém diferiram dos valores obtidos nos tempos 8 e 12 horas.

No tratamento T3, os valores médios da viscosidade dos extratos de proteínas obtidos nos tempos 0 e 4 não diferiram entre si, ao nível de 5% de significância. Entre 8 e 12 horas de fermentação também não houve diferença significativa.

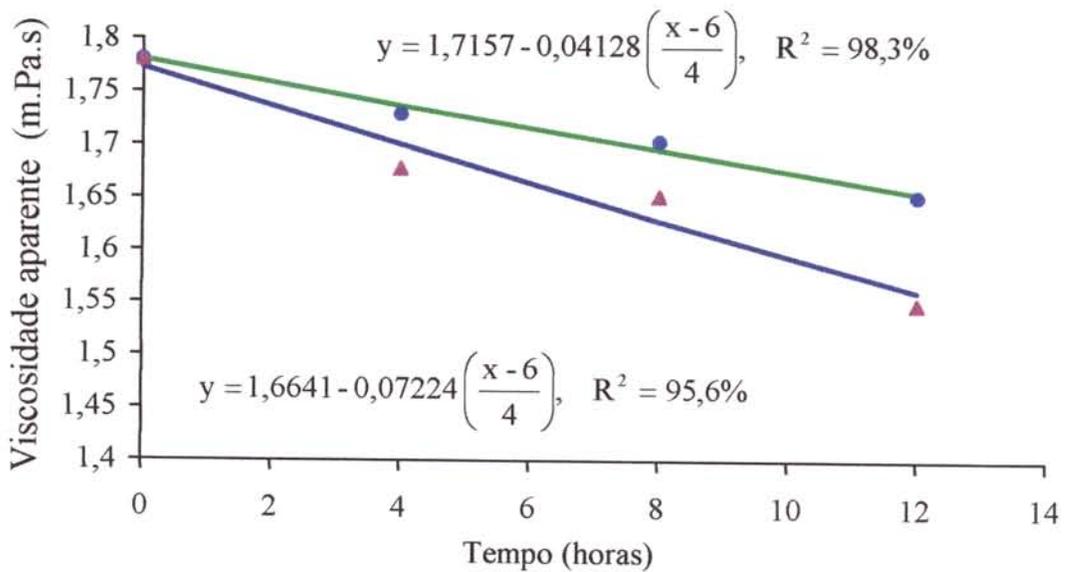
Considerando os estudos realizados por DOESCHER & HOSENEY (1985a) sobre mudanças que ocorrem durante a fermentação da esponja e os resultados obtidos nesta pesquisa acredita-se que a diminuição no pH da esponja resulte em redução significativa na viscosidade, devido a maior atividade das enzimas proteolíticas em valores de pH próximos a 4,1, mostrando, portanto, que as proteases são responsáveis pela diminuição na viscosidade dos extratos de proteínas. Os mesmos autores constataram, em seis amostras de extratos protéicos, uma queda de viscosidade como resultado da fermentação, afirmando, que a enzima proteolítica age no pH baixo para quebrar algumas das ligações peptídicas, o que confirma os resultados encontrados neste trabalho, onde observou-se efeito linear da viscosidade em função do tempo (APÊNDICE 5).

As Figuras 24 e 25 mostram os efeitos da protease fúngica (400 e 500ppm) e bacteriana (200 e 250ppm), respectivamente, nas viscosidades das proteínas das massas do *cracker*.



**Figura 24 - Efeito da protease fúngica nas concentrações 400ppm (T2 ●) e 500ppm (T3 ▲) sobre a viscosidade dos extratos de proteínas da massa durante a fermentação**

Na Figura 25, constata-se a diminuição da viscosidade dos extratos de proteína ao longo da fermentação no tratamento com protease bacteriana (200ppm e 250ppm)



**Figura 25 - Efeito da adição de protease bacteriana 200ppm (T4 ●) e 250ppm (T5 ▲) sobre a viscosidade das proteínas da massa durante a fermentação**

A tabela 18 apresenta os resultados da viscosidade aparente dos tratamentos T1 após 18 horas de fermentação e de T2, T3, T4 e T5 após 12 horas de fermentação.

**Tabela 18 – Viscosidade aparente dos extratos de proteínas da massa do *cracker* no tempo final de fermentação dos tratamentos estudados**

<b>Tratamento</b>	<b>Viscosidade aparente (m.Pa.s)</b>
Convencional (T1)	1,6512 <sub>a</sub>
Fúngica (T2)	1,7028 <sub>a</sub>
Fúngica (T3)	1,6777 <sub>a</sub>
Bacteriana (T4)	1,6512 <sub>a</sub>
Bacterina (T5)	1,5480 <sub>b</sub>

Médias seguidas da mesma letra nas linhas são consideradas iguais pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância

Pelo teste de Tukey verificou-se que os valores obtidos nos tratamentos T2, T3 e T4 após 12 horas de fermentação, não diferiram, ao nível de 5% de significância do valor obtido no tratamento T1 (convencional) após 18 horas. Entretanto, apenas o resultado do tratamento T5 diferiu dos demais.

A Figura 26 mostra o comportamento da viscosidade aparente dos extratos da proteína nos tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5 durante a fermentação das esponjas do *cracker* com e sem adição de proteases fúngica ou bacteriana.

Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que as viscosidades aparente dos extratos de proteínas das massas nos tratamentos T2, T3 e T4, após 12 horas de fermentação, foram iguais a do processo convencional (18 horas) o que representa uma redução de 33,3% do tempo de fermentação na presença de enzimas, as quais tiveram certamente ação hidrolítica no glúten.

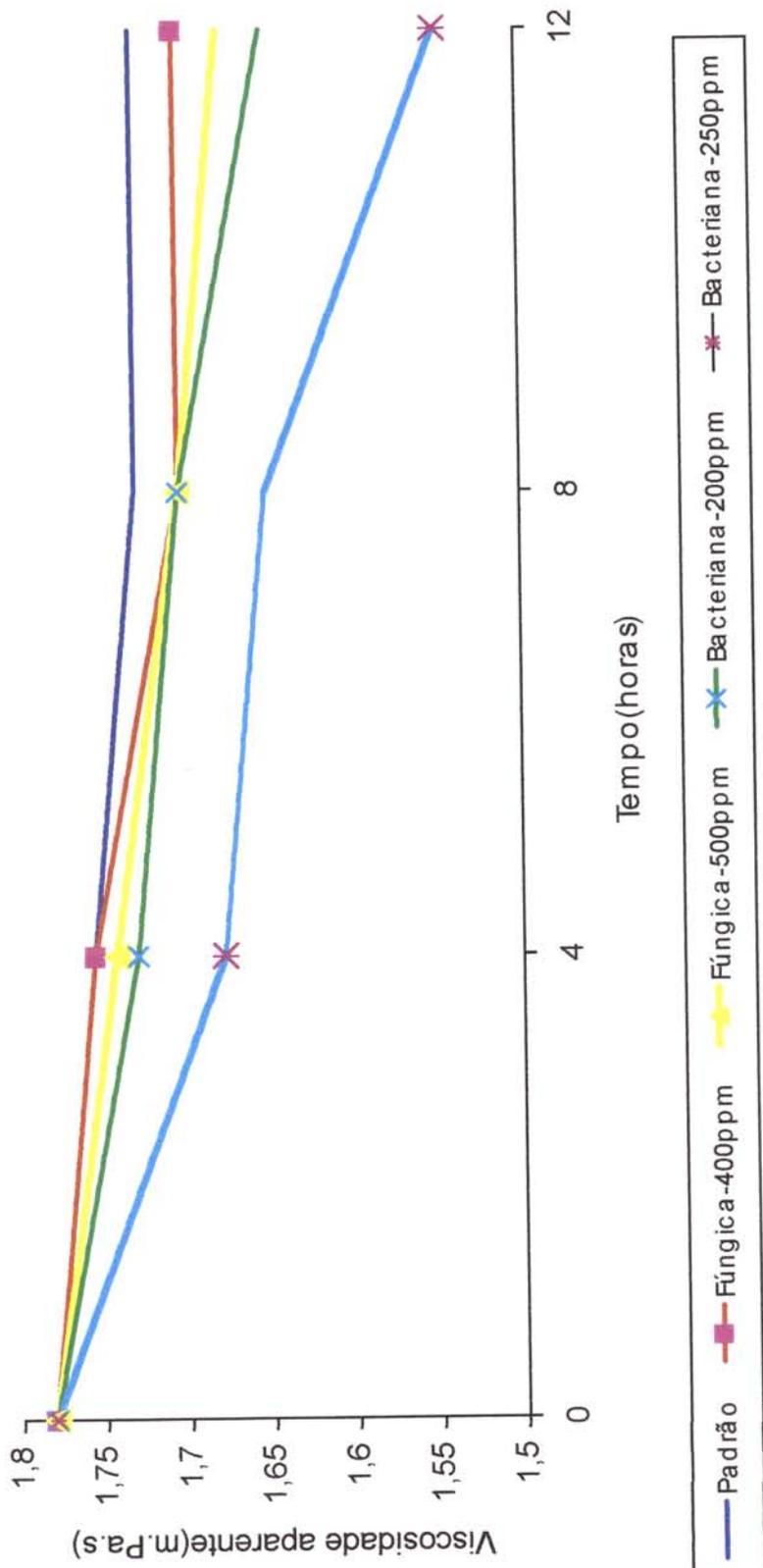


Figura 26 - Representação gráfica da viscosidade aparente dos extratos de proteínas da massa nos tratamentos sem e com adição de proteases, durante a fermentação

A Tabela 19 e Figura 27 mostram as viscosidades relativas dos extratos das proteínas da massa do *cracker* nos tratamentos estudados (T1, T2, T3, T4, T5)

**Tabela 19 - Viscosidade relativa dos extratos das proteínas das massas do cracker nos vários tempos de fermentação**

Tratamentos	Tempo de fermentação (horas)				
	0	4	8	12	18
Convencional (T1)	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Protease fúngica (T2)	1,0000	1,0000	0,9850	0,9850	-
Protease fúngica (T3)	1,0000	0,9926	0,9850	0,9705	-
Protease bacteriana (T4)	1,0000	0,9850	0,9850	0,9552	-
Protease bacteriana (T5)	1,0000	0,9550	0,9550	0,8955	-

A viscosidade relativa da proteína diminuiu com o aumento do tempo de fermentação, e pela adição de proteases fúngica ou bacteriana.

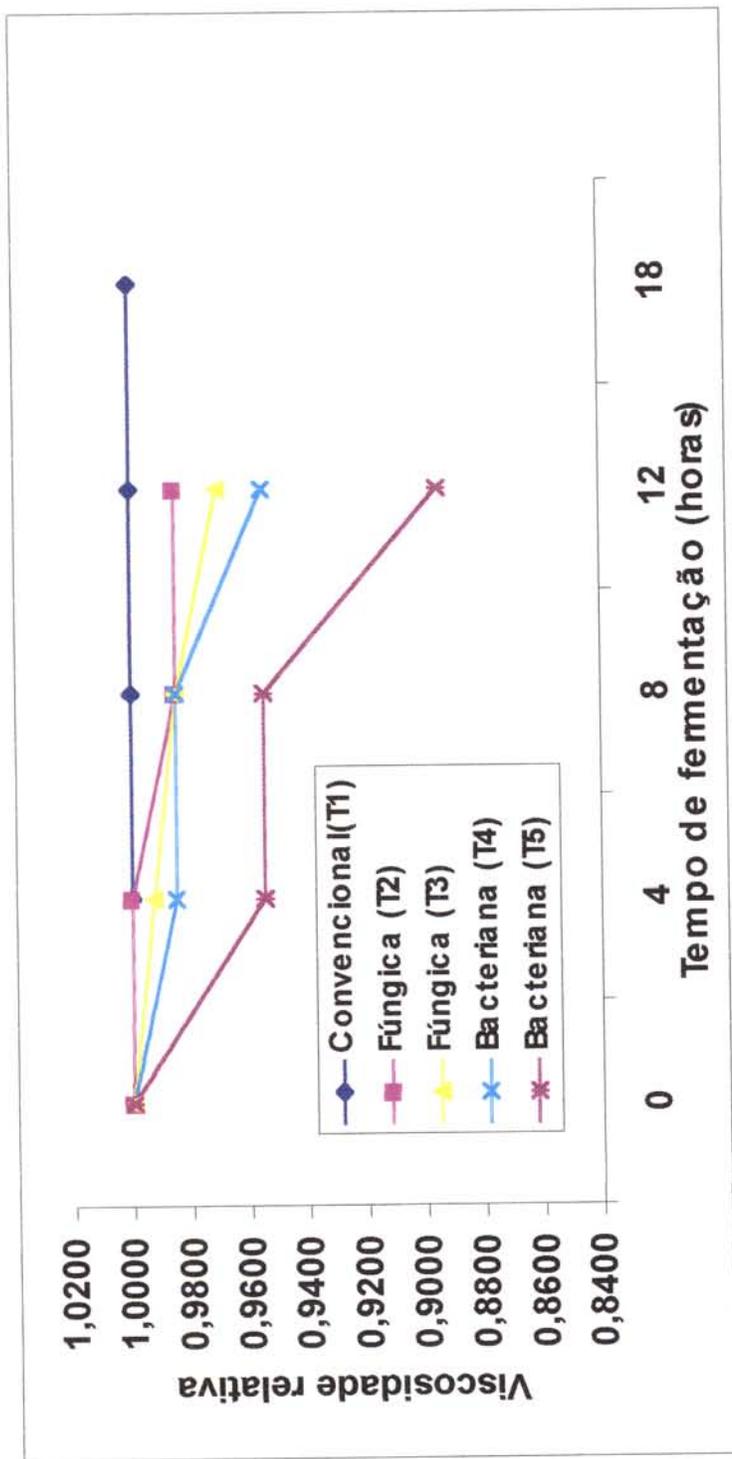
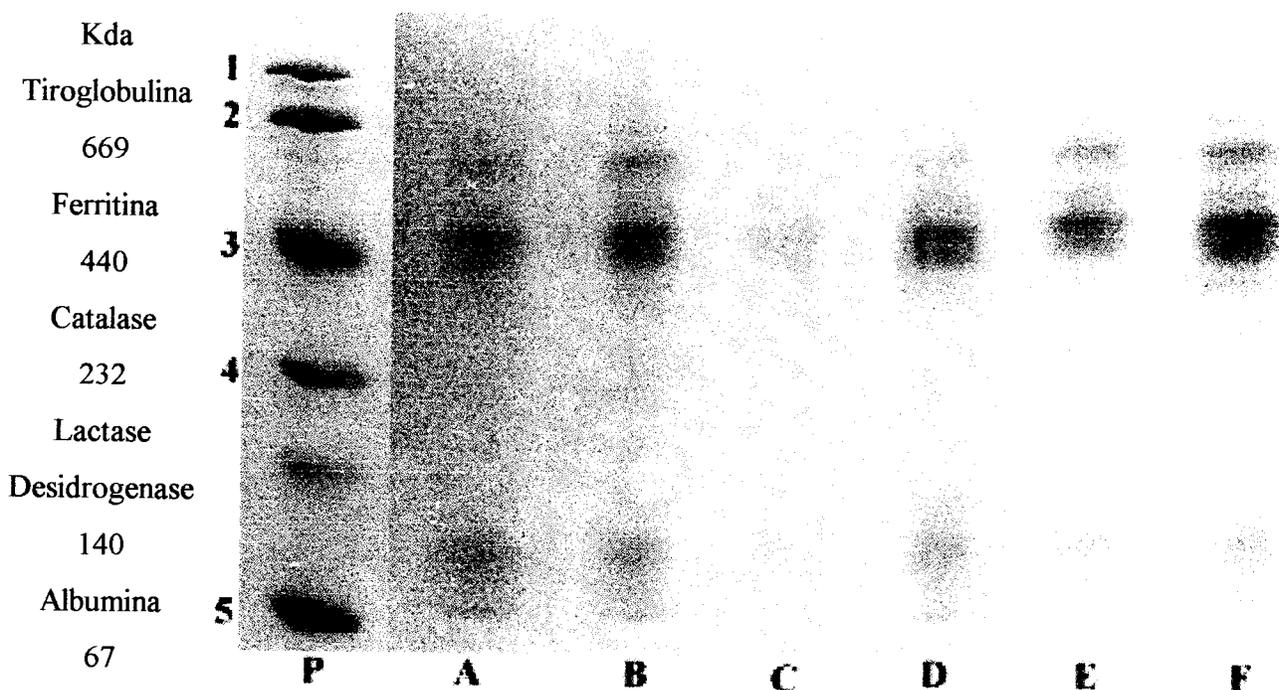


Figura 27 – Viscosidade relativa dos extratos da proteína das massas do cracker nos tratamentos estudados

### 3.3. *Efeito do tempo de fermentação da esponja do cracker, sem e com adição de proteases, no perfis eletroforéticos das proteínas totais*

As proteínas totais das massas fermentadas no processo convencional (T1), sem fermentação e após 18 horas de fermentação e nos tratamentos (T2), (T3),(T4) e (T5), após 12 horas de fermentação foram separadas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). O gel teve, então, suas bandas analisadas visualmente conforme mostrado na Figura 28:



**Figura 28 - Eletroforese de proteínas totais das massas do cracker designadas por A, B, C, D, E, F. A canaleta P refere-se ao padrão de peso molecular contendo: 1. Tiroglobulina (669.000), 2. Ferritina (440.000).**

**3. Catalase (232.000), 4. Lactatato desidrogenase (140.000),  
5. Albumina (67.000)**

Onde:

A - Tratamento sem protease (convencional), 0 hora de fermentação

B - Tratamento sem protease, (convencional), 18 horas de fermentação

- C - Tratamento com protease fúngica (400ppm), 12 horas de fermentação
- D - Tratamento com protease fúngica (500ppm), 12 horas de fermentação
- E - Tratamento com protease bacteriana (200ppm), 12 horas de fermentação
- F - Tratamento com protease bacteriana (250ppm), 12 horas de fermentação

O número de bandas e seus respectivos pesos moleculares para cada tratamento foram obtidos através do densitômetro (Tabela 20).

A análise da Figura 28 mostrou que o tratamento A (processo convencional, 0 horas de fermentação) apresentou perfil eletroforético diferente dos demais tratamentos, com 12 bandas de peso molecular variando na faixa de 94,8 a 356 Kda.

O tratamento B revelou um perfil eletroforético similar a D, ambos com 15 bandas de peso molecular variando de 83 a 405 Kda e 82,0 a 363,1 Kda, respectivamente.

Os perfis eletroforéticos das proteínas nos tratamentos E e F foram diferenciados ligeiramente por terem sido observados 15 bandas com pesos moleculares na faixa de 83,0 a 364,4 Kda, e 16 bandas com pesos moleculares variando de 85,1 a 361,8 Kda, respectivamente. Foi notado grande proximidade dos perfis eletroforéticos dos tratamentos E e F. Comparando-se o tratamento B, correspondente as 18 horas de fermentação do processo convencional com os tratamentos D, E e F no tempo de fermentação de 12 horas, verificou-se uma maior intensidade no aparecimento das bandas de proteínas nos tratamentos com enzimas.

**Tabela 20 – Efeito da adição de proteases na esponja nos perfis eletroforéticos das proteínas da massa do cracker**

<b>Tratamentos</b>	<b>Tempo de fermentação (horas)</b>	<b>Nº de bandas</b>	<b>Kda(faixa)</b>
A	0	12	94,8-356,7
B	18	15	83,0-405,4
C	12	5	97,3-228,3
D	12	15	82,0-363,1
E	12	16	83,0-364,4
F	12	15	85,1-361,8

A análise eletroforética mostrou no processo convencional um aumento do número de bandas de proteínas em função do aumento do tempo de fermentação. Entretanto nos processos com adição de proteases apareceram bandas adicionais de proteínas, mostrando maior degradação protéica, em um menor tempo de fermentação (12 horas).

#### **4.Efeito da adição de proteases, fúngica ou bacteriana, nos tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5 na qualidade dos *crackers***

##### **4.1. Avaliação da Qualidade dos *crackers***

A avaliação da qualidade dos *crackers*, nos tratamentos T1, T3 e T5, com e sem adição de proteases na formulação, foi feita através das determinações de pH, umidade, medidas físicas de tamanho e análises instrumentais de cor e textura.

##### **4.1.1. Umidade e pH**

A tabela 21 apresenta os valores de umidade e pH dos *crackers* nos tratamentos estudados. Foi verificado que os *crackers* produzidos em laboratório pelo processo convencional-T1 apresentaram teor de umidade dentro da faixa normalmente encontrada industrialmente (3 - 4%), conforme mencionado por VITTI et al. (1988). Segundo WADE (1988) o conteúdo de umidade tem importante efeito na vida de prateleira do *cracker*, e em alguns tipos de biscoitos poderá influenciar na ocorrência da espontânea fratura ou *checking*. Os valores de pH também encontram-se na faixa apropriada para biscoitos, conforme PYLER (1982). No entanto, os testes T3 e T5, com adição de proteases, apresentaram teores de umidade e valores de pH superiores aos encontrados nos testes sem proteases. Os valores de pH mais altos podem ser decorrentes do menor tempo de fermentação da esponja no processo com proteases (12 horas), em relação ao processo convencional (18 horas). Estes resultados são confirmados pelo trabalho de PIZZINATTO & HOSENEY(1980b) que verificaram que o aumento do tempo de fermentação diminui o pH da massa e do produto final.

**Tabela 21 - Efeito da adição de proteases fúngica ou bacteriana no pH e na umidade dos *crackers***

<b>Tratamentos</b>	<b>Umidade(%)</b>	<b>pH</b>
Processo convencional	3,40	7,02
Protease fúngica	4,00	7,12
Protease bacteriana	4,00	7,18

<sup>1</sup>protease fúngica (500ppm)

<sup>2</sup>protease bacteriana (250ppm)

#### **4.1.2. Efeito dos tratamentos T1, T3 e T5 nas medidas físicas de dimensão e densidade dos *crackers***

Os resultados das medidas físicas dos *crackers* efetuadas em 30 unidades de biscoitos nos tratamentos T1, T3 e T5 estão apresentados na tabela 22.

**Tabela 22 - Efeitos da adição de proteases fúngica ou bacteriana nas medidas físicas (dimensão e densidade) dos crackers processados**

Tratamentos	Peso do		Volume (cm <sup>3</sup> )	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	Comprimento (cm)	Largura (cm)	Espessura (cm)
	cracker cru (g)	cracker cozido (g)					
Processo convencional (T1)	7,36 <sub>a</sub>	5,45 <sub>a</sub>	11,57 <sub>b</sub>	0,47 <sub>b</sub>	6,41 <sub>b</sub>	0,60 <sub>a</sub>	0,57 <sub>a</sub>
Protease fúngica (T3)	7,48 <sub>a</sub>	5,53 <sub>a</sub>	12,49 <sub>a</sub>	0,44 <sub>c</sub>	6,67 <sub>a</sub>	0,59 <sub>b</sub>	0,51 <sub>b</sub>
Protease bacteriana (T5)	7,32 <sub>a</sub>	5,40 <sub>a</sub>	10,84 <sub>c</sub>	0,49 <sub>a</sub>	6,63 <sub>a</sub>	0,58 <sub>b</sub>	0,50 <sub>b</sub>

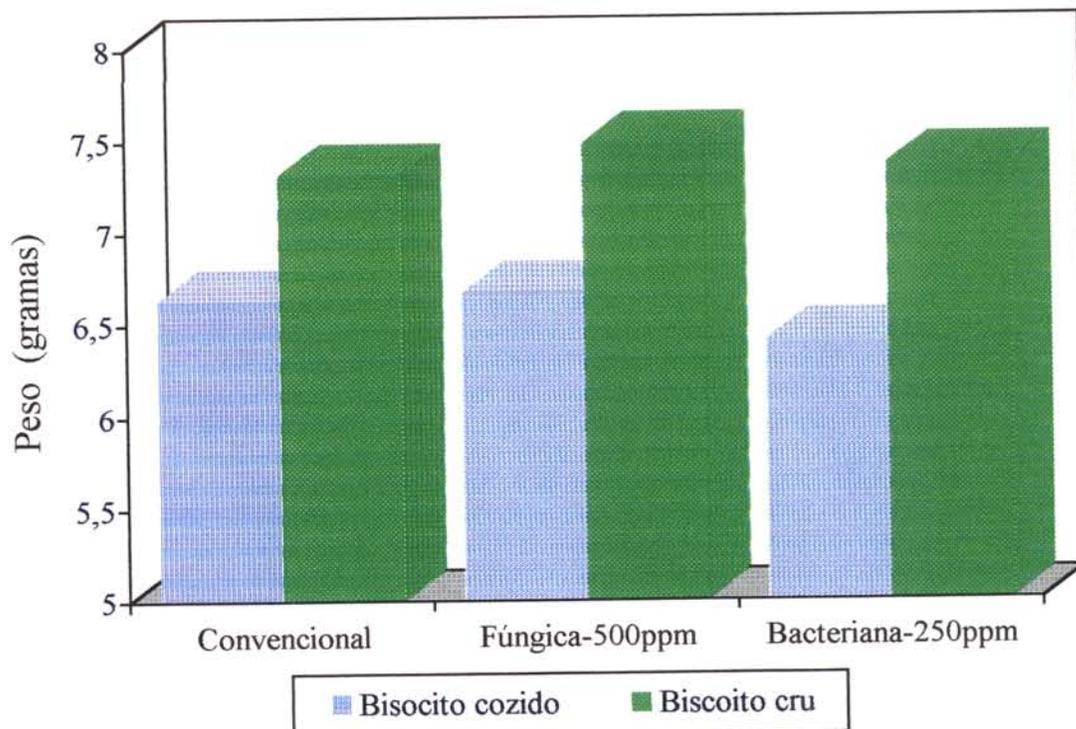
Médias seguidas de mesma letra nas colunas são consideradas iguais ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

#### 4.1.2.1. Efeito no peso (g) do *cracker* cru e cozido

Os valores dos pesos dos biscoitos (Tabela 22) mostraram a redução dos pesos dos *crackers* crus após o cozimento (Figura 29).

Através das análises de variância, (APÊNDICE 6) para os pesos dos *crackers* crus e cozidos verificou-se que não houve efeito de tratamentos. Esses resultados não concordaram com os encontrados por ROGERS & HOSENEY (1989b), que afirmaram que os pesos dos *crackers* diminuem quando o tempo de fermentação aumenta.

Os resultados encontrados mostraram que a adição de proteases na formulação, nos tratamentos T3 e T5, não interferiu nos pesos dos *crackers*, apesar da redução do tempo de fermentação da esponja de 18 para 12 horas. Entretanto ROGERS & HOSENEY (1989b) afirmaram que as maiores mudanças no peso dos *crackers* não são atribuídas apenas ao aumento das modificações que ocorrem na proteína da esponja. Esses autores acreditam que as leveduras necessárias para a produção de gás diminuem a densidade da massa e conseqüentemente o peso do *cracker*. Assim, quando o tempo de fermentação aumenta o peso do *cracker* diminui indicando uma contínua modificação na proteína ou aumento na produção de gás.



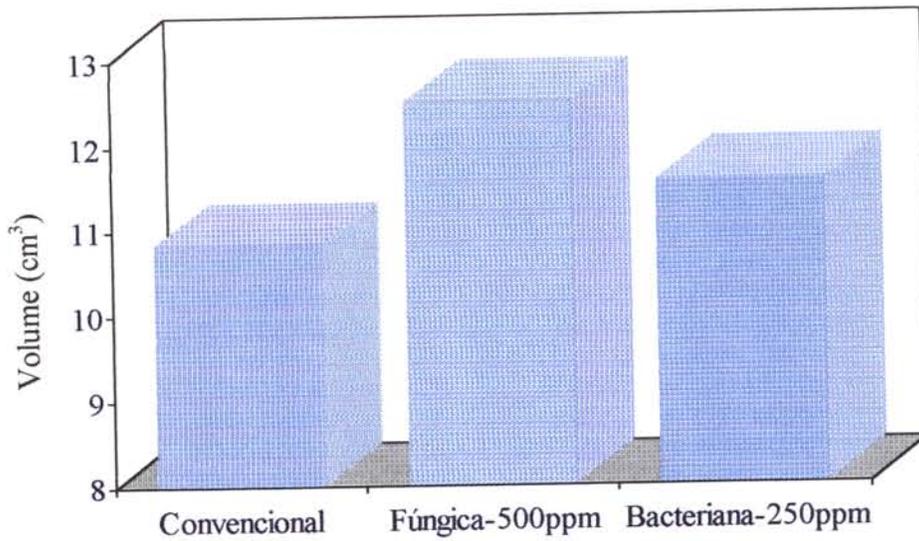
**Figura 29 - Avaliação da redução do peso dos crackers crus após o cozimento**

#### 4.1.2.2. Efeito no volume e densidade dos *crackers*

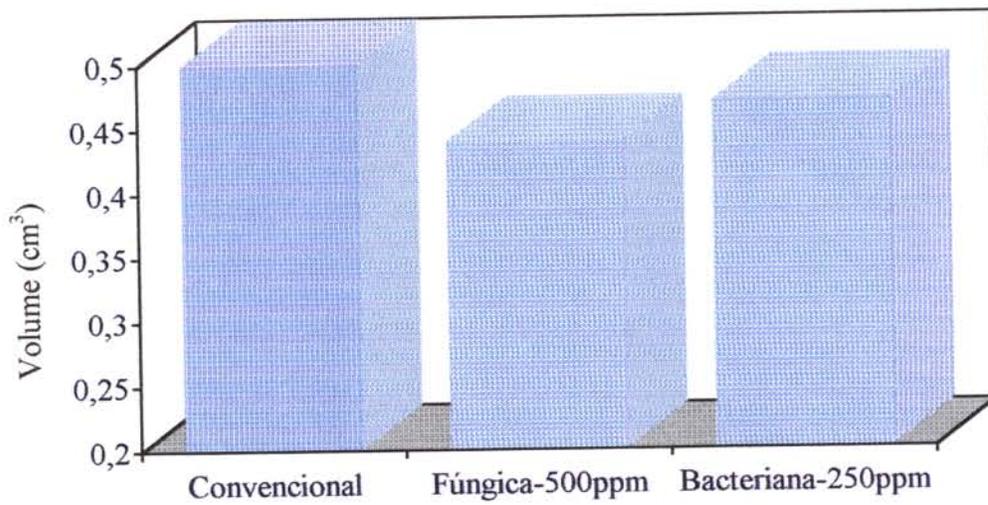
A análise de variância (ANOVA), APÊNDICE 6, para o volume e densidade dos *crackers* mostrou que houve efeito de tratamento. No teste de comparação de médias verificou-se que os valores obtidos nos tratamentos convencional (T1), com proteases fúngica (T3) e protease bacteriana (T5) diferiram entre si, ao nível de 5% de significância, tanto para a medida de volume como para a medida de densidade dos *crackers*. Essas diferenças entre os tratamentos podem ser visualizadas nas Figuras 30 e 31.

O tratamento com protease fúngica foi mais eficiente na obtenção de maior volume e menor densidade dos *crackers*, o que foi provavelmente devido a atividade enzimática desta protease na massa. De acordo com MONNIER & GODON (1975) o uso de proteases resulta em menor densidade dos *crackers*. Entretanto, SATHE et al.

(1981) admitem que essas diferenças na densidade poderão ter sido causadas pelas diferenças no aumento do volume de cada unidade de *cracker* durante o cozimento.



**Figura 30 - Efeitos da adição de proteases fúngica ou bacteriana no volume dos *crackers***



**Figura 31 – Efeitos da adição de protease fúngica ou bacteriana densidade dos *crackers***

#### **4.1.2.3. Efeito no comprimento dos *crackers***

Através da ANOVA, (APÊNDICE 6) para medida de comprimento, verificou-se que houve efeito de tratamento. Através do teste de Tukey, observou-se que esse parâmetro nos tratamentos com proteases fúngica (T3) e bacteriana (T5) não diferiram entre si, ao nível de 5% de significância, entretanto diferiram significativamente, em relação do tratamento convencional (T1), ao nível de 5%. Este resultado pode ser justificado pela adição de proteases na esponja do *cracker* e pela redução do tempo de fermentação (12 horas).

#### **4.1.2.4. Efeito na largura dos *crackers***

A ANOVA (APÊNDICE 6), para a largura dos *crackers* mostrou que houve efeito de tratamento ou seja a adição de proteases na fase esponja alterou a largura dos *crackers*.

#### **4.1.2.5. Efeito na espessura dos *crackers***

Na ANOVA (APÊNDICE 6) para a medida da espessura constatou-se efeito de tratamento. O teste de Tukey de comparação de médias para espessura mostrou que os tratamentos T3 e T5 não diferiram entre si, ao nível de 5% de significância, porém diferiram do tratamento T1 (convencional).

Estes resultados podem ser explicados pelas modificações das proteínas e também pelo aumento da produção de gás, devido a ação das proteases fúngica ou bacteriana nas proteínas, na fase de fermentação das esponjas nos testes T3 e T5, o que possibilitou a diminuição da espessura dos *crackers*, conforme afirmaram ROGERS & HOSENEY (1989b). Além disso, PIZZINATTO & HOSENEY (1980a) pressupõem que as massas, nessas condições, são mais facilmente laminadas.

#### 4.1.3. Efeito dos tratamentos na cor e textura dos *crackers* avaliados por medidas instrumentais

##### 4.1.3.1. Efeito na cor dos *crackers*

A cor dos biscoitos processados em laboratório nos tratamentos T1, T3 e T5 podem ser visualizados na Figura 31.

Os resultados dos parâmetros (L, a\*, b\*) de cor nos tratamentos T1, T3 e T5 são apresentados na tabela 23.

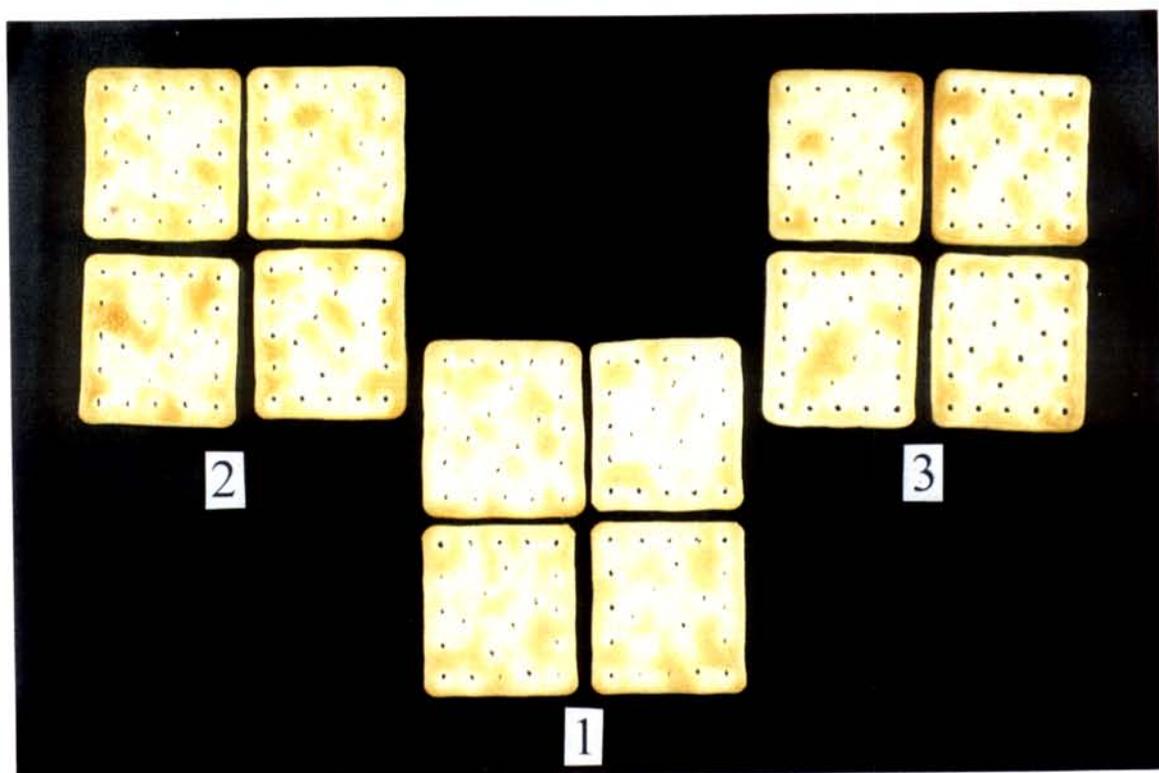
**Tabela 23 - Parâmetros de cor (L, a\* b\*) dos *crackers* obtidos nos processos convencional (T1) e com adição de proteases fúngicas (T3) e bacteriana (T5)**

	L	a*	b*	$\Delta E$
Processo convencional T1	75,7 <sub>b</sub>	6,0 <sub>a</sub>	33,0 <sub>a</sub>	-
Com protease fúngica T3	76,5 <sub>b</sub>	4,8 <sub>a</sub>	31,3 <sub>a</sub>	2,2
Com protease bacteriana T5	78,8 <sub>a</sub>	3,0 <sub>b</sub>	29,0 <sub>b</sub>	5,9

Sendo: L=luminosidade. a\*=vermelho. b\*=amarelo

As médias seguidas da mesma letra nas colunas são consideradas iguais ao nível de 5%, pelo teste de Tukey

Com relação a luminosidade, os biscoitos dos tratamentos T3 e T5 foram mais claros do que os obtidos pelo processo convencional, observando-se que os *crackers* com protease bacteriana apresentaram maiores valores de luminosidade diferindo significativamente dos demais, ao nível de 5%, pelo teste de Tukey.



**Figura 32 – Crackers processados em laboratório:**

- 1. Tratamento convencional (sem adição de proteases) - T1**
- 2. Tratamento com protease fúngica - T3**
- 3. Tratamento com protease bacteriana - T5**

Os teores de vermelho ( $a^*$ ) e amarelo ( $b^*$ ) foram reduzidos nas amostras tratadas com as proteases, em relação à convencional. O biscoito T3, com protease fúngica apresentou visualmente cor mais próxima a do *cracker* obtido pelo processo convencional, do que a produzida pelo tratamento T5 com protease bacteriana, o que foi confirmado pelos valores de  $\Delta E$ . Com relação ao teor de vermelho e amarelo, a amostra da protease bacteriana diferiu estatisticamente das demais, ao nível de 5%.

#### 4.1.3.2. Efeito na textura (dureza) dos *crackers*

Na tabela 24 estão apresentados os resultados da textura dos *crackers* obtidos sem e com adição de proteases

A medida da textura foi avaliada pelo parâmetro dureza, que está relacionado com a força necessária para quebrar o biscoito.

**Tabela 24 - Medidas de dureza dos *crackers* obtidos pelo processo convencional T1 e pelos processos com adição de proteases fúngica T3 ou bacteriana T5**

Tratamentos	Dureza(g) <sup>1</sup>
Processo convencional T1	1.352,83 <sub>a</sub>
Com protease fúngica T3	919,30 <sub>b</sub>
Com protease bacteriana T5	1.006,16 <sub>b</sub>

<sup>1</sup>As médias seguidas da mesma letra, são consideradas iguais a nível de 5% pelo teste de Tukey

A ANOVA, (APÊNDICE 6), para a textura dos *crackers* detectou efeito de tratamento. O teste de Tukey mostrou que os resultados obtidos nos tratamentos T3 e T5 não diferiram entre si, ao nível de 5% de significância, porém diferiram do valor obtido no processo convencional. As medidas da textura (dureza) foram menores nos tratamentos com proteases (T3 e T5) que no processo convencional, mostrando claramente o efeito positivo das proteases na qualidade do *cracker* produzido. Estes resultados estão de acordo com MONNIER & GORDON (1975), quando mencionam que os efeitos das proteases nas propriedades plásticas do glúten refletem na textura do produto final. Esclarecem ainda que, a dispersão ou 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.

## V. Conclusões

De acordo com o trabalho realizado e com base nos resultados apresentados e discutidos anteriormente, pode-se concluir que:

1. Durante a fermentação da esponja, no processo convencional de produção de *crackers*, foram observados o abaixamento do pH e modificações nas propriedades viscoelásticas da massa, medidas pela diminuição nos valores de resistência à extensão e resistência máxima.
2. O uso de protease fúngica possibilitou a redução do tempo de fermentação da massa do *cracker*. A fermentação da esponja por 12 horas, produziu modificações desejáveis nas propriedades extensográficas do glúten das massas, iguais aquelas que ocorrem na massa fermentada por 18 horas no processo convencional.
3. A solubilidade da proteína da massa do *cracker* (processo convencional) aumentou ao longo do processo fermentativo. No entanto, esta solubilidade é aumentada quando adiciona-se proteases fúngica ou bacteriana na fase esponja do *cracker*. Desta forma as proteínas são mais solúveis em menor tempo de fermentação, do que aquelas oriundas das massas não tratadas com proteases.
4. Na escolha da protease (origem e teor) a ser adicionada na fase esponja do *cracker* deve ser considerada a sua atividade hidrolítica no glúten. Após 12 horas de fermentação da esponja, a maior solubilidade da proteína, indicativo da maior atividade hidrolítica, foi obtida na massa na presença de enzima fúngica (500ppm), quando comparada com a enzima bacteriana (250ppm).
5. A determinação das viscosidades aparente dos extratos protéicos das massas durante a fermentação da esponja do *cracker* (com ou sem a adição de enzima), pode ser usada como uma medida da atividade proteolítica nas proteínas do glúten. O

aumento de tempo de fermentação diminuiu os valores deste parâmetro. A presença de 250ppm de protease bacteriana apresentou o menor valor de viscosidade aparente no tempo final de fermentação da esponja do *cracker*.

6. A análise eletroforética das proteínas das massas mostrou aumento do número de bandas de proteínas em função do aumento do tempo de fermentação da esponja, no processo convencional. Nos processos com adição de proteases ocorreu o aparecimento de bandas proteicas adicionais, indicativo de maior degradação protéica, em menor tempo de fermentação (12 horas), em relação ao processo convencional (18 horas).
7. A avaliação da qualidade dos *crackers* produzidos em laboratório mostrou que os tratamentos com proteases, fúngica e bacteriana, apresentaram características semelhantes com relação aos valores de peso do biscoitos crus, cozidos e resfriados, comprimento, largura, espessura, pH, umidade e textura, diferenciando-se nos resultados da análise de cor, volume e densidade.
8. Os *crackers* produzidos com proteases fúngica e bacteriana apresentaram valores de peso do biscoito cru e cozido, similares aos dos *crackers* obtidos pelo processo convencional.
9. Os resultados da análise de cor dos *crackers* processados com protease fúngica foram comparativamente semelhantes aos obtidos no tratamento convencional.
10. A adição de proteases fúngica ou bacteriana na esponja melhorou a qualidade dos *crackers* com relação ao parâmetro de qualidade dureza, os quais foram menores em relação ao do processo convencional.
11. A adição de proteases de origem fúngica ou bacteriana na fase esponja do processamento do *cracker* é de interesse tecnológico porque estas enzimas promovem modificações mais rápidas nas proteínas do glúten, permitindo assim

reduzir, de maneira marcante, o longo tempo de fermentação da esponja e, ao mesmo tempo, manter a qualidade do biscoito.

12. A avaliação geral dos parâmetros de qualidade das massas e dos *crackers* mostrou que a adição de proteases, fúngica ou bacteriana, nas condições estabelecidas no presente estudo, permitiram produzir *crackers* de boa qualidade tecnológica com redução de 20% do tempo de mistura no preparo da esponja, e redução de 37,5% (9 horas) do tempo total de fermentação do processo, referentes a 33,33% e 50% do tempo de fermentação da esponja e massa, respectivamente.

## VI. APÊNDICES

**APÊNDICE 1** – Análise de variância para resistência a extensão da massa do *cracker* nos vários tempos de fermentação no processo convencional (T1), processo com adição de protease fúngica (T2, T3) e protease bacteriana (T4, T5)

Fonte de variação	gl	SQ	MSQ	F	P	R <sup>2</sup> (%)
Parcelas	20	890920,24	44546,01	54,36**	0,0000	
<b>Tratamentos(T)</b>	(4)	53886,25	13471,56	16,44**		
<b>Tempo(t)</b>	(3)	711743,44	237247,81	289,49**		
<b>T x t</b>	(12)	34723,75	2893,65	3,53ns		
<b>Convencional(T1)</b>						
Linear	(1)	135301,25	135301,25	165,09**		91,4
Quadrático	(1)	12656,25	12656,25	15,44**		99,9
Cúbico	(1)	61,25	61,25	0,07ns		
<b>Protease fúngica(T2)</b>						
Linear	(1)	186245,00	186245,00	227,25**		90,9
Quadrático	(1)	7225,00	7225,00	8,82**		94,5
Cúbico	(1)	11300	11300	13,78**		100,0
<b>Protease fúngica(T3)</b>						
Linear	(1)	185281,25	185281,25	226,08**		98,1
Quadrático	(1)	3306,25	3306,25	4,03*		99,9
Cúbico	(1)	281,25	281,25	0,34ns		
<b>Protease bacteriana (T4)</b>						
Linear	(1)	80327,81	80327,81	98,02**		98,7
Quadrático	(1)	264,06	264,06	0,32ns		
Cúbico	(1)	812,81	812,81	0,99ns		
<b>Protease bacteriana (T5)</b>						
Linear	(1)	134480,00	134480,00	164,09**		99,8
Quadrático	(1)	0,0000	0,0000	0,0000ns		
Cúbico	(1)	45,000	45,000	0,05ns		
<b>Adicional</b>	(1)	90566,8	90566,8	110,51**		
<b>Resíduo</b>	63	51630,75	819,54			
<b>Total</b>	83	942550,99		CV=9,2%		

**APÊNDICE 2** – Análise de variância para resistência máxima da massa do *cracker* nos vários tempos de fermentação no processo convencional (T1), processo com adição de protease fúngica (T2, T3) e protease bacteriana (T4, T5)

Fonte de variação	gl	SQ	MSQ	F	P	R <sup>2</sup> (%)
<b>Parcelas</b>	20	1203301,95	61165,14	93,55**	0,0000	
<b>Tratamentos(T)</b>	(4)	63257,3	15814,325	24,6**		
<b>Tempo(t)</b>	(3)	1003689,35	334563,11	520,25**		
<b>T x t</b>	(12)	46799,9	3899,99	6,06*		
<b>Convencional(T1)</b>					89,8	
Linear	(1)	204020,00	204020,00	317,26**	97,2	
Quadrático	(1)	16900,00	16900,00	26,28**	100	
Cúbico	(1)	6480,00	6480,00	10,07**		
<b>Protease fúngica(T2)</b>					99,0	
Linear	(1)	248422,05	248422,05	386,3**		
Quadrático	(1)	1482,25	1482,25	2,30ns		
Cúbico	(1)	1022,45	1022,45	1,59ns		
<b>Protease fúngica(T3)</b>					98,2	
Linear	(1)	261061,25	261061,25	405,95**	99,9	
Quadrático	(1)	4556,25	4556,25	7,08*		
Cúbico	(1)	151,25	151,25	0,24ns		
<b>Protease bacteriana (T4)</b>					99,5	
Linear	(1)	122461,25	122461,25	190,43**		
Quadrático	(1)	156,25	156,25	0,24ns		
Cúbico	(1)	451,25	451,25	0,70ns		
<b>Protease bacteriana (T5)</b>					99,5	
Linear	(1)	182405,00	182405,00	283,6**		
Quadrático	(1)	900,00	900,00	1,39ns		
Cúbico	(1)	20,00	20,00	0,03ns		
<b>Adicional</b>	(1)	89555,4	89555,4	139,26**		
<b>Resíduo</b>	63	40514,00	643,079			
<b>Total</b>	83	1243816,952		CV=7,6%		

**APÊNDICE 3** – Análise de variância para extensibilidade da massa do *cracker* nos vários tempos de fermentação no processo convencional (T1), processo com adição de protease fúngica (T2, T3) e protease bacteriana (T4, T5)

Fonte de variação	GI	SQ	MSQ	F	P	R <sup>2</sup> (%)
<b>Parcelas</b>	20	9864,0714	493,2036	11,3422**	0,0000	
<b>Tratamentos(T)</b>	(4)	3103,325	775,831	17,84**		
<b>Tempo(t)</b>	(3)	2208,700	736,233	16,93**		
<b>T x t</b>	(12)	4502,675	375,223	8,63**		
<b>Convencional(T1)</b>						
Linear	(1)	3001,25	3001,25	69,02**		89,2
Quadrático	(1)	2,25	2,25	0,05ns		
Cúbico	(1)	361,25	361,25	8,31**		100,0
<b>Protease fúngica(T2)</b>						
Linear	(1)	72,2	72,2	1,66ns		91,8
Quadrático	(1)	576,00	576,00	13,25**		
Cúbico	(1)	57,8	57,8	1,33ns		
<b>Protease fúngica (T3)</b>						
Linear	(1)	101,25	101,25	2,33ns		99,1
Quadrático	(1)	1122,25	1122,25	25,81**		
Cúbico	(1)	11,25	11,25	0,26ns		
<b>Protease bacteriana (T4)</b>						
Linear	(1)	1102,61	1102,61	25,36**		81,7
Quadrático	(1)	33,06	33,06	0,76ns		
Cúbico	(1)	214,51	214,51	4,93ns		
<b>Protease bacteriana (T5)</b>						
Linear	(1)	12,01	12,01	0,28ns		
Quadrático	(1)	3,06	3,06	0,07ns		
Cúbico	(1)	40,61	40,61	0,93ns		
<b>Adicional</b>	(1)	49,37	49,37	1,14ns		
<b>Resíduo</b>	63	2739,5600	43,4841			
<b>Total</b>	83	12603,5714		CV=7%		

**APÊNDICE 4** – Análise de variância da solubilidade das proteínas, em SDS, da massa do *cracker*

<b>Fonte de variação</b>	<b>GI</b>	<b>SQ</b>	<b>MSQ</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Tratamentos	4	303,70	75,93	81,63**	0,0000
Resíduo	25	23,25	0,93		
Total	29	326,95		CV=2,9%	

APÊNDICE 5 – Análise de variância da viscosidade dos extratos de proteínas da massa do *cracker* sem e com adição de protease fúngica e bacteriana

Fonte de variação	gl	SQ	MSQ	F	P	R <sup>2</sup> (%)
<b>Parcelas</b>	20	0,1384	0,0069	20,7905**	0,0000	
<b>Tratamentos(T)</b>	(4)	0,0033	0,008	24,00**		
<b>Tempo(t)</b>	(3)	0,076	0,025	75,00**		
<b>T x t</b>	(12)	0,020	0,002	6,00*		
<b>Convencional (T1)</b>						
Linear	(1)	0,0033	0,0033	9,9*		89,2
Quadrático	(1)	0,0003	0,0003	0,9ns		
Cúbico	(1)	0,0001	0,0001	0,3ns		
<b>Protease fúngica (T2)</b>						
Linear	(1)	0,0081	0,0081	24,3**		90,0
Quadrático	(1)	0,0003	0,0003	0,9ns		
Cúbico	(1)	0,0006	0,0006	1,8ns		
<b>Protease fúngica (T3)</b>						
Linear	(1)	0,0121	0,0121	36,3**		99,2
Quadrático	(1)	0,0001	0,0001	0,3ns		
Cúbico	(1)	0,0000	0,0000	0,0ns		
<b>Protease bacteriana (T4)</b>						
Linear	(1)	0,0170	0,0170	5,1*		98,3
Quadrático	(1)	0,0000	0,0000	0,0ns		
Cúbico	(1)	0,0003	0,0003	0,9ns		
<b>Protease bacteriana (T5)</b>						
Linear	(1)	0,0522	0,0522	156,6**		95,6
Quadrático	(1)	0,0000	0,0000	0,0ns		
Cúbico	(1)	0,0024	0,0024	7,2*		
<b>Adicional</b>	(1)	0,0284	0,0284	9,47**		
<b>Resíduo</b>	21	0,0070	0,003			
<b>Total</b>	41	0,154		CV=1,01%		

APÊNDICE 6 – Análise de variância das medidas físicas dos *crackers* processados sem e com adição de proteases

1. Análise de variância do comprimento

Fonte de variação	gl	SQ	MSQ	F	P
Tratamentos	2	1,1712	0,5856	32,8173**	0,0000
Resíduo	87	1,5525	0,0178		
Total	89	2,7237		CV=2,03%	

2. Análise de variância da densidade

Fonte de variação	gl	SQ	MSQ	F	P
Tratamentos	2	0,0465	0,0233	27,0167	0,0000
Resíduo	87	0,0749	0,0009		
Total	89	0,1214		CV=6,2%	

3. Análise de variância da espessura

Fonte de variação	gl	SQ	MSQ	F	P
Tratamentos	2	0,0875	0,0438	49,1**	0,0000
Resíduo	87	0,0776	0,0009		
Total	89	0,1651		CV=5,6%	

4. Análise de variância da largura

Fonte de variação	gl	SQ	MSQ	F	P
Tratamentos	2	0,4732	0,2366	14,9717	0,0000
Resíduo	87	1,3749	0,0158		
Total	89	1,8481		CV=2,125	

5. Análise de variância do volume

Fonte de variação	Gl	SQ	MSQ	F	P
Tratamentos	2	41,1769	20,5884	53,1996	0,0000
Resíduo	87	33,6693	0,3870		
Total	89	74,8462		CV=5,3%	

6. Análise de variância do peso do biscoito cozido

Fonte de variação	Gl	SQ	MSQ	F	P
Tratamentos	2	0,3072	0,1536	2,7512ns	0,0694
Resíduo	87	4,8567	0,0558		
Total	89	5,1638			

7. Análise de variância do peso do biscoito cru

Fonte de variação	Gl	SQ	MSQ	F	P
Tratamentos	2	0,4416	0,2208	2,7241ns	0,0712
Resíduo	87	7,0524	0,0811		
Total	89	7,4940		CV=3,8%	

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCHELE, W.J. Cookie and cracker processing. *Cereal Foods World*, v.26, n. 4, p.161-165, 1981.
- AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. *Approved methods of the American Association of Cereal Chemists*. 8ed. St.Paul 1983 A A C.C. v. 1 e v.2.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO. **Compêndio de Legislação de Alimentos**: consolidação das Normas e Padrões de Alimentos. São Paulo.ABIA, 1988. v. 1.
- ATTENBURROW, G., BARNES, D. J.; DAVIES, A . P.; INGMAN, S. J. Rheological Properties of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*. v. 12, p. 1-14, 1990.
- BARRET, F. F. Enzymes use in the milling and baking industries. In: REED, G. *Enzymes in food processing*. 2ed. New York: Academic Press, 1975. p.301-330.
- BEDNARCYK, N. E. Nutrient contributions of cookies and cracker. *Cereal Foods World*, v.35, n.5, p. 367-369, 1987.
- BLIGH, E. G., DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, v.37, n.8, p.911-917, 1959.
- BLOKSMA A. H.; BUSHUK W. Rheology and Chemistry of Dough. In: POMERANZ, Y. *Wheat chemistry and technology*, 3ed. St. Paul.: American Association of Cereal Chemists, 1988. v.2, p.131-217.
- BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 2ed. São Paulo: Varela, 1995. 151p.
- BRUNO, M. E. *Utilização de proteases de origem bacteriana e fúngica na produção de biscoitos semi-doces duros*. Campinas, 1989. 123p. Tese (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- BRUNO, M. E. C.; CAMARGO, C. R. O. Enzimas proteolíticas no processamento de biscoitos e pães. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v.29, n.2, p.170-178, 1995.

- BUSHUK, W. Flour proteins: structure and functionality in dough and bread. *Cereal Foods World*, v.30, n.7, p.447-451, 1985.
- BUSHUK, W. A brief history of the International workshop on gluten proteins. *Cereal Foods World*. Canada, v. 41, n. 4, p. 194-198, april, 1996.
- CAMPBELL, W. P. & LEE, J. W. Structure function in some components of the wheat grain. *Lebensmittel wissenschaft und Technology*, v. 15, n. 1, p.1-4, 1982.
- COLE, M. S. An overview of modern dough conditioners. *Bakers Digest*. v.47, n. 6, p. 21-23, 64, 1973.
- CONTAMINE, A. S.; ABECASSIS, J.; MOREL, M. H.; VERGNES, B.; VEREL, A. Effect of mixing conditions on the quality of doughs and biscuits. *Cereal Chemistry*, v.76, n. 6, p. 516-522, 1995.
- CREIGHTON, D. W.; HOSENEY, R. C. Use of a Kramer Shear Cell to Measure Cracker Dough Properties. *Cereal Chemistry*. v.67, n. 2, p.107-111, 1990a.
- CREIGHTON, D. W. & HOSENEY R. C. Use of a kramer shear cell to measure cracker flour quality. *Cereal Chem*. V. 67, n. 2, p. 111-114, 1990b.
- DANNO, G; HOSENEY, R. C. Changes in flour proteins during dough mixing. *Cereal Chemistry*. v.59, n. 4, p. 249-253, 1982a.
- DANNO, G; HOSENEY, R. C. Effect of dough mixing and rheologically active compounds on relative viscosity of wheat proteins. *Cereal Chemistry*. v.59, n. 3, p. 196-198, 1982 b.
- DOESCHER, L. C. e HOSENEY, R. C. Saltine crackers changes in cracker sponge rheology and modification of a cracker-baking procedure. *Cereal Chemistry*. v.62, n.3, p.158-162, 1985 a.
- DOESCHER, L. C. e HOSENEY, R. C. Evaluation of commercial cracker flours by test baking and study of changes occurring during sponge fermentation. *Journal of Cereal Science* , v.3, p.261-270, 1985b.
- DUCROO, P. Étude de l'action des proteases sur la farine de blé au moyen du farinographe Brabender. *Ann Technol. Agric* v.23, n. 2, p. 249-256, 1974.
- EL DASH, A A Standardized mixing and fermentation procedure for experimental baking test. *Cereal chemistry*. v.55, n. 4, p. 436-446.

- EL DASH, A. A. The precursors of bread flavor: Effect of fermentation an proteolitic activity. *Bakers Digest*. v.45, p.26-31, 1971.
- EL DASH, A.; DIAZ, N.A M.; CAMARGO, C. R. *Os Fundamentos da tecnologia de panificação*. São Paulo, Secretaria de Industria Comércio, Ciência e Tecnologia, 1982. p. 245-282, série Tecnologia Industrial, 6.
- EL-DASH,A. A.; JOHNSON, J. A. Proteases enzymes: effect on bread flavor. *Cereal Sci. Today*. v.12, n. 7, p. 282-288, 1967.
- FANCE, W. J. *The student's technology of breadmaking and flour confectionery*. 3<sup>a</sup> ed, London: Routledge and Kegan Paul, 1976. p.72-81.
- FARIDIH H. A.; JOHNSON J. A. Saltine cracker flavour I. changes in organic acids and soluble nitrogen constituents of cracker sponge and dough. *Cereal Chemistry*. v.55, n.1, p. 7-15, 1978.
- FIELDS M. L.; VARRIANO-MARSTON. Microbiology of cracker sponge fermentation. *Cereal Chemistry*. v. 59, n. 1, p. 23-26, 1982.
- FOX. P. F.; MULVIHILL. D. M. Enzymes in wheat, flour and bread In: POMERANZ, Y. *Advances Cereal Science and Technology*. St. Paul, Minesota: A.A.C.C., 1982. v.5, p.107-156.
- GAINES C. S.; FINNEY P. L. Measurement of the water uptake rate of crackers. *Cereal Chemistry*. v.65, n. 6, p. 471-473, 1988.
- GAMS, T.C. Der Einsatz von mikrobieller Enzymen in der Backerei. *Getreide, mehl und Brot*. v. 30, n. 5, p.113-116, 1976.
- GUÉRIVIÈRE, J. F. de la; BUSSIÈRE, G. Utilization des protéases das les industries de cuisson de céréales. *Ann. Technol. Agric*. v. 23, n. 2, p. 257-268, 1974.
- GUILBOT, A. Emploi des enzymes dans les industries de cuisson des products à base de céréales. *Ann. Technol. Agric*. v. 21, n. 3, p.237-252, 1972.
- HALVERSON, J.; ZELENY, L. Criteria of wheat quality. In: POMERANZ, Y. *Wheat chemistry and technology*, 3ed. St. Paul, Minesota, A.A.C.C., 1988, v.1. cap.2, p.15-31.
- HAMED-FARIDI, Short-Time Saltine cracker. *Bakers Digest*, June, 1980.

- HASEBORG, E. ter. Enzymes in flour and baking applications, especially waffle batters. *Process Biochem.* v.16, n. 5, p. 16-17, 19, 1981.
- HOLMES, J. T.; HOSENEY, R. C. Chemical Leavening: Effect of pH and Certain Ions on Breadmaking Properties. *Cereal Chemistry*. v. 64, n.4, p. 343-348, 1987.
- HOSENEY, R. C. *Principles of Cereal Science and Technology*, Zaragoza: Editorial Acibia, S.A., 1991, 321p.
- HOSENEY, R. C.; WADE, P.; FINLEY, J. W. Soft wheat Products. In: POMERANZ. *Wheat Chemistry and Technology*, 3ed. St. Paul: A.A.C.C., 1988. Vol. 2. p. 407-456.
- ISHIDA k.; NAGASAKI, M. Effects of proteases on textural properties of wheat flour dough, *Nippon Shokulin Kogyo Gakkaish*, 36(12):964-967, (1989b).
- ISHIDA k.; NAGASAKI, M. Use of proteases in biscuits processing. *Nippon Shokulin Kogyo Gakkaish*, v. 36, n. 12, p. 964-967, (1989a).
- JOHNSON, J. A.; MÜLLER, B. S. The relationship between dough consistency and proteolytic activity. *Cereal Chemistry*. v. 30, n. 6, p.471-479, 1953.
- JUNGSCHAFFER, G. Enzyme kleine helfer mit grosser wirkung. **Brot & Backaren** Darmstadt, v.41, n. 11, p. 19-21, 1993.
- JUODEIKIENE, G.; SCHLEINING, G.; KUNIGELIS, V.; ADOMAITIS, V.; Theoretisher und experimentell ermittelter zusammenhang zwischen akustischen und strukurellen Eigenschaften von *cracker*. *Ernaehreing*. v. 18, n. 5, p. 235-237, 1994.
- KENT, N. L. *Technology of Cereals*. 2ed. New York: Pergamon Press, 1975, p. 43-73.
- KERSTELEY, K. & DE LEY, J. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. *J. General Microbiol.*, v. 87, p.333-342, 1975.
- KRUGER, J. E.; REED, G. Enzymes and color. In: POMERANZ, Y. *Wheat, chemistry and technology*. St. Paul:American Association of Cereal Chemists, 1988. v. 1, p. 441-500.

- LABUDA, C. S.; STEGMANN C. HUANG, R. Yeasts and their role in flavour formation. *Cereal Foods World*, v. 42, n. 10, p. 797-799, 1997.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, n. 227, p. 676-685, 1970.
- LAJOIE, M. S.; THOMAS, M. C. Sodium bicarbonate particle size and neutralization in sponge-dough systems. *Cereal Foods World*, v. 39, n. 9, p. 684-687, 1994.
- LÁSZTITY, R. *The Chemistry of Cereal Proteins*, Flórida: CRC Press, Inc., 1984, p.68-71.
- LEHNINGER, A. L. *Princípios de bioquímica*. Trad. de W. R. Lodi e A. A. Simões. São Paulo: Savier Editora de Livros Médicos Ltda, 1985. 725p.
- LIN, W. D. A., LOOKHART, G.; HOSENEY, R. C. Partially purified proteolytic enzymes from wheat flour and their effect on elongational viscosity of *cracker* sponges. *Cereal Chemistry*, v. 70, n. 4, p. 448-452, 1993.
- LÖFFLER, A. Proteolytic enzymes: sources and applications. *Food Technol.* v. 40, n.1, p. 63-70, 1986.
- LYONS, T. P. Proteinase enzymes: relevant to the baking industry. *Biochem. Soc. Trans.* v. 10, n. 4, p. 287-290, 1982.
- MAILHOT, W. C.; PATTON, J. C. Criteria of flour quality. In: POMERANZ, Y. *Wheat chemistry and technology*, 3ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1988, vol 2, p. 69-88.
- MARSTON, P. E.; WANNAM, T. L. Bread baking: the transformation from dough to bread. *Bakers Digest*, p.59-64, july-august, 1983.
- MASOUR, K. H. Quality control in soft wheat flour. *Cereal Foods World*, v. 27, n. 7, p. 315-316, 1982.
- MATHEWS, K. C.; VAN HOLDE, K. E.; Biochemistry. New York: The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. 1990. cap. 10. Enzymes: Biological Catalysts p. 339-380.
- MATZ, S. A. *Cookie and cracker technology*. Westport: Avi Publishing Company, 1968. 320p.

- MILLER, R. A.; HOSENEY, R. C. Use of elongational viscosity to estimate cookie diameter. *Cereal Chemistry*, v. 74, n. 5, p. 614-616, 1997.
- MONNIER, B.; GODON, B. Utilization des proteases dans les industries de cuisson. *Ind. Alim. et Agric.* v. 92, n. 5, p. 521-529, 1975.
- MOONEN, H.; KIRSCH, P. The integrated food approach in bakery products. *Food Technology International Europe*. p. 93-96, 1995.
- NG, P.K. BUSHUK. Glutenin of marquis wheat as a reference for estimating molecular weights of glutenin subunits by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electroforesis. *Cereal chemistry*. v. 64, n.4, p.324-327, 1987.
- NIKOLAIDIS A.; LABUZA, T. P. Glass transition state diagram of a baked cracker and its relationship to gluten. *Journal of Food Science* v. 61, n. 4, p. 803-86, 1966.
- NIMAN, S. Cargill Foods-Salt Products. *Cereal Foods World*, v. 41, n. 9, p.729-731, 1996.
- OLIVER, J. R.; ALLEN, H. M. The mixing requirement of the australian hard wheat cultivar, dollarbird. *Cereal Chemistry*, v. 7, n. 1, p. 51-54. 1994.
- PETIT, L; AUDIDIER, Y. Action des protéinases dans les industries de cuisson. *Ann Nutr. Alim.* v. 21, n. 6, p. 341-360, 1967.
- PIZZINATTO, A. Aspectos sobre a produção de biscoitos tipo cracker: Considerações sobre a matéria-prima e o processamento *Boletim ITAL* Campinas, v. 16, n. 2, p. 165-189, abr./Jun. 1979.
- PIZZINATTO, A.; HOSENEY, R. C. Rheological changes in crackers sponges during fermentation. *Cereal Chemistry*, v. 57, n. 3, p. 185-188, 1980b.
- PIZZINATTO, A.; HOSENEY, R. C. A Laboratory method for saltine crackers. *Cereal Chemistry*, v. 57, n. 4, p. 249-252, 1980a.
- POMERANZ, Y. *Modern Cereal Science and Technology*, VHC Publishers, New York, 1987, 485p.
- PYLER, E. J. Baking Science & Technology. 2 ed. Chicago: Siebel Publishing Company, 1982. v. 1. 121-163, 144-161, p. 246-247.

- RENZO, D. J. Baker products yeast leavened. London: Noyes data corporation, 1975, p.417-421.
- RICHARDSON, T.; HYSLOP, D. B. Enzymes. In: *Fenema*. Food Chemistry. 2<sup>a</sup>. ed. New York: Marcel Dekker, Inc. 1985. cap. 6, p.371-476.
- ROGERS, D. E.; HOSENEY, R. C. A fractionation and reconstitution method for saltine cracker flours. *Cereal Chemistry*. v. 66, n.1,p. 3-6, 1989a.
- ROGERS, D. E.; HOSENEY, R. C. Effects of fermentation in saltine cracker production. *Cereal Chem.* v.66, n. 1, p. 6-10, 1989b.
- ROGERS, D. E.; HOSENEY, R. C. Test to determine the optimum water absorption for Saltine cracker doughs. *Cereal Chemistry*. v. 64, n.6, p. 370-372, 1987.
- SANG, Y. K.; BYUNG, L. don; JUNG, M. K.; DEOK, K. O. Effect of concentrations of wheat flour and sugar on sponge fermentation of soda cracker. Korean Journal of food science and technology, v. 29, n. 2, p. 387-389, 1997.
- SATHE, S. K.; TAMHANE, D. V.; SALUNKHE, D. K. Studies in Saltine *crackers* (Khara Biscuits): II. Protein enrichment and sotorage stability. *Cereal Foods World*, v. 26, n. 8, p. 407-409, 1981.
- SCHMITT, M. Enzyme products for manufacturing biscuits, *Crackers* and Waffers. **Food Marketing & Technology** v.8, n. 2, p. 14-16, 1994.
- SHIIBA, K.; NEGISHI, Y.; OKADA, L.; NAGAO, S. Chemical changes during sponge-dough fermentation. *Cereal Chemistry*. v. 67, n. 4, p. 350-355, 1990.
- SI. J. Q. Synergistic effect of enzymes for breadbaking. **Cereal Foods World**. v.42, n. 10, p. 802-807, 1997.
- SMITH, W. H. Biscuits, crackers; cookies: tecnology, production and management. London: Applied Science Publishers, 1972. v. 1, 737p.
- SPRÖBLER, B. Wirkung von Proteinasen beim Zusatz zum Mehl. *Getreide. Mehl und Brot* v. 35, n. 3, p. 60-62, 1981.
- STEWART, J. Snack cracker production: how to chose ingredients and methods. *Bakers Digest*. v. 58, n. 4, p. 20, 22, 24, 1984.

- SUGIHARA, T. F. Microbiology of the soda cracker process I. isolation and identification of microflora. *Journal of food Protection* v. 41, n. 12, p. 977-979, 1978.
- TANILLI, V. H. 1976. Characteristics of wheat for cookie and cracker production. *Cereal Foods World*, v. 21, n. 12, p. 624-644, 1976.
- THE BISCUIT AND CRACKER MANUFACTURES ASSOCIATION. Biscuit and cracker handbook. Washington, B & CMA. Washington, 1981.
- THOMSON, L. S. Flour needs for the commercial *cracker* process. *Cereal Foods World*, v. 21, n. 12, p. 642-620, december, 1976.
- VITTI, P.; GARCIA, E. E. C.; OLIVEIRA, L. M. Tecnologia de Biscoitos. *Manual Técnico nº1*. ITAL, 1988. 86p.
- WADE, P. Technology of biscuit manufacture: investigation of the role of fermentation in the manufacture of cream crackers. *J.Sci.Fd.Agric.*, v. 23, p. 1021-1034, 1972a.
- WADE, P. Flour properties and the manufacture of cream cracker. *J. Sci. Fd. Agric.* v. 23, p. 1221-1228, 1972b.
- WADE, P. Technology of biscuit manufacture: Investigation of the process for making cream cracker. *J. Sci. Fd. Agric.* v. 23, p. 1213-1219, 1972c.
- WADE, P. *Biscuits, cookies e crackers*: The principles of the Craft. New York: Elsevier Applied Science, 1988. v.1 176p.
- WANNERBERGER, M. W.; WAHLCREN, M.; ELIASSON, C. Adorption of proteins fractions from wheat onto methylated silica surfaces. *Cereal Chemistry*. v. 73, n. 4, p. 499-505, 1996.
- WHITELEY, P.R. *Biscuit Manufacture fundamentals of in line production*. London: Elsevier Publishing Company LTD, 1971. p. 1-17, 32, 103-123, 161-196.
- WOLFMEYER, H. J.; HELMAN, N. N. Malt as an adjunct in *cracker* baking. *Cereal Science today* . v. 5, n. 7, p. 208-214, 1960.
- WOODS, F. C. BRUINSMA B. L., KINSELLA, J. E. Note on the effects of protease from *Saccharomyces carlsbergences* on dough strengh. *Cereal Chemistry*. v.57, n.4, p. 290-293, 1980.

- WU, J. Y.; HOSENEY, R. C. Rheological changes in cracker sponges during the first five hours of fermentation, *Cereal Chemistry*. v. 66, n. 3, p. 182-185, 1990.
- WU, J. Y.; HOSENEY, R. C. Rheological changes in cracker sponges during an 18 hour fermentation. *Cereal Chemistry*. v. 66, n. 3, p.182-185, 1989.