

## A temperatura no desenvolvimento da atividade das enzimas (1-3, 1-4)- $\beta$ -glucanases e degradação de $\beta$ -glucanos durante a malteação

### Temperature on the development activity of (1-3, 1-4)- $\beta$ -glucanases enzyme and degradation of $\beta$ -glucanos during malting

Marcos Antônio Beleti<sup>I,II</sup> Felipe Duarte<sup>II</sup> Janaína Endres Georg-Kraemer<sup>III</sup>

#### RESUMO

Algumas características relacionadas à qualidade do malte podem ser trabalhadas não só ao nível genético e/ou como respostas de interações ambientais, mas também ao nível de processo industrial. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da temperatura sobre a atividade das  $\beta$ -glucanases e degradação de  $\beta$ -glucanos durante os quatro dias finais de germinação do processo de malteação. Quatro cultivares de boa qualidade de malteação (*N721*, *N743*, *Scarlett* e *Sebastian*) foram analisadas e os resultados obtidos demonstraram que elas tiveram desempenho diferente quanto à atividade enzimática e à degradação de  $\beta$ -glucanos nas diferentes temperaturas testadas. A utilização de temperatura um pouco mais elevada no início da germinação (22°C) foi a mais efetiva na produção das variáveis estudadas. Para a cultivar *N721*, constatou-se o melhor desempenho comparativamente às demais, indicando um padrão mais homogêneo de degradação de  $\beta$ -glucanos durante a germinação e também maior eficiência na degradação desde as 96 horas do processo. Alta atividade das  $\beta$ -glucanases e redução no tempo de malteação são de extremo interesse para a indústria malteira, pois representa uma otimização no volume de malte produzido e conseqüentemente uma redução de custos para a sua produção.

**Palavras-chave:** *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*, cevada, qualidade do malte.

#### ABSTRACT

Some characteristics related to the quality of malt can be worked not only at the genetic level and/or as responses to environmental interactions, but also in industrial process. This study assesses the effect of temperature on  $\beta$ -glucanase

activity and on the degradation of  $\beta$ -glucans during the last four days of germination, in the malting process. Four cultivars of good quality malting (*N721*, *N743*, *Scarlett* and *Sebastian*) were analyzed and the results showed they had different performance on the enzyme activity and  $\beta$ -glucan degradation, at the different temperatures tested. A slightly higher temperature at the beginning of germination (22°C) was more effective in terms of the variables studied. Cultivar *N721* presented the best performance compared to other cultivars, revealing a more homogeneous pattern of  $\beta$ -glucan degradation during germination and also increased efficiency in degrading  $\beta$ -glucans as early as in the 96<sup>th</sup> hour of the germination process. High activity of  $\beta$ -glucanases and shorter time is very interesting to the brewery industry, since it represents an optimization of the malt volume produced and a cost reduction for its production.

**Key words:** *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*, barley, malt quality.

#### INTRODUÇÃO

A cevada é o quinto grão de maior importância econômica no mundo e no Brasil, cujo principal uso é para a indústria cervejeira. Porém, o grão não pode ser utilizado diretamente na produção de cerveja, pois seu sistema enzimático não está capacitado para transformar o amido, que está presente nas células do endosperma, em açúcares fermentáveis, os quais são necessários para a produção da cerveja. Inicialmente, é preciso realizar a malteação do grão e este processo é dividido em três etapas: maceração (embebição), germinação e secagem. Na maceração,

<sup>I</sup>Curso de Ciências Biológicas, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brasil.

<sup>II</sup>Maltaria Navegantes - Companhia Brasileira de Bebidas (AmBev), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>III</sup>Laboratório da Biodiversidade Vegetal, Programa de Pós-graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, ULBRA, Prédio 22, 4<sup>a</sup> andar, 92425-900, Canoas, RS, Brasil. E-mail: janaina.kraemer@terra.com.br. \*Autor para correspondência.

espera-se que o grão alcance igual teor de água para dar início à ativação do metabolismo; na germinação artificial, objetiva-se o enriquecimento enzimático, aliado às transformações das substâncias de reserva; e, na secagem, os objetivos são encerrar os processos químico-biológicos e fornecer o sabor, o aroma característico e a cor específica do malte (McELROY & JACOBSEN, 1995).

Assim, as transformações bioquímicas necessárias para a modificação do grão ocorrerão na etapa da germinação controlada, pois, com a absorção de água, o metabolismo será induzido e haverá a ativação e a formação de várias enzimas como as  $\alpha$ -glucanases,  $\alpha$ -amilases, parte das hemicelulases e proteases (KUNTZ & BAMFORTH, 2007).

Na germinação de sementes de cevada, um dos eventos iniciais é a degradação das paredes celulares do endosperma amiláceo pelas enzimas (1-3, 1-4)-  $\alpha$ -glucanases (EC 3.2.1.73) (WOODWARD & FINCHER, 1982a), permitindo o acesso de várias enzimas aos seus substratos dentro das células e promovendo a conversão do amido em açúcares fermentáveis, principalmente maltose e glicose. As (1-3, 1-4)-  $\alpha$ -glucanases hidrolisam os (1-3, 1-4)- D-glucanos - um polímero linear de glicose ligado por pontes  $\alpha$ -(1-4) e  $\alpha$ -(1-3) - o principal componente das paredes das células do endosperma da cevada (WOODWARD & FINCHER, 1982b).

A degradação ineficiente das paredes celulares prejudica a difusão das enzimas de germinação, a mobilização de reservas do grão e, em decorrência, reduz o extrato do malte;  $\alpha$ -glucanos residuais podem também levar a um aumento na viscosidade do mosto e da cerveja, aumentando os problemas de filtração nas cervejarias e transparência do produto final (McELROY & JACOBSEN, 1995), de forma que a seleção de cultivares com baixa concentração de  $\alpha$ -glucanos é um dos principais objetivos de programas de melhoramento.

Nesse sentido, cultivares de cevada selecionadas para fins cervejeiros não devem ter apenas características para um bom desempenho a campo, como também aquelas relacionadas à produção de malte com qualidade. No entanto, a dificuldade para a seleção destas características é que a maioria delas é controlada pela expressão e geralmente pela interação de um conjunto de genes que normalmente sofrem forte influência ambiental (SATO et al., 2001), pois altas temperaturas durante o inverno e excesso de chuvas na hora da colheita, por exemplo, resultam em prejuízo na formação do amido e aumentam a concentração de  $\alpha$ -glucanos no grão (ZHANG et al., 2001).

Algumas características relacionadas à qualidade do malte podem ser trabalhadas não só ao nível genético e/ou como respostas de interações ambientais, mas também ao nível de processo industrial. Determinados fatores influenciam diretamente na atividade das enzimas e consequentemente determinam a intensidade com que o malte se modifica, assim, as variáveis que o malteador pode usar para controlar estes fatores na germinação são: a temperatura que pode variar entre 12 a 26°C; umidade do grão entre 42 e 48% e adição de ácido giberélico. Entretanto, esses valores dependem muito da matéria prima e do malte que se busca produzir. TOFFOLI et al. (2003) comentaram que o nível de desenvolvimento de enzimas hidrolíticas pode ser influenciado pelo processo de malteação em si, utilizando-se uma faixa de variação de temperatura entre 13 a 25°C, sendo que uma maior temperatura no início do processo de germinação produziria maltes com maior atividade enzimática e baixa viscosidade.

A possibilidade de poder reverter uma inadequação dos grãos com relação à qualidade exigida pela indústria malteira permitiria reduzir processos, ou seja, tempo e custos para a indústria. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura sobre a atividade das  $\alpha$ -glucanases e degradação de  $\alpha$ -glucanos durante os quatro dias finais de germinação do processo de malteação em cultivares de boa qualidade e utilizadas atualmente pela indústria malteira.

## MATERIAL E MÉTODOS

Quatro cultivares de cevada cervejeira de boa qualidade de malteação foram analisadas, sendo duas nacionais ( $\alpha$ -N7210e  $\alpha$ -N7430) e duas estrangeiras ( $\alpha$ -Scarlett0 da Argentina e  $\alpha$ -Sebastian0 da França). As sementes foram obtidas através da Companhia Brasileira de Bebidas (AmBev) - Filial Maltaria Navegantes, Porto Alegre - RS e as análises foram realizadas no seu laboratório de controle de qualidade.

O processo de malteação foi feito em uma unidade de micromalteação, a qual utiliza uma quantidade menor de grãos (500g) que o processo industrial, porém mantém as características do mesmo. Um programa padrão de maceração para as quatro cultivares, com duas horas de embebição (grãos em contato com a água), seis horas a seco (aeração) e novamente duas horas de embebição foi utilizado. Para iniciar a etapa de germinação, foi determinado o teor de água dos grãos, conforme normas analíticas EBC (European Brewery Convention), o qual foi de 13% para os grãos das quatro cultivares. Para os grãos atingirem teor de água de 46%, foram feitas duas

dosagens de água até o terceiro dia, conforme normas analíticas EBC. O cálculo da quantidade de água necessária para atingir este teor de água considera o peso e a umidade inicial da amostra para determinar o peso que a amostra deverá alcançar com o teor de água desejado, cujo peso foi obtido, então, com a adição de água. Para padronizar a metodologia foi adicionada a mesma quantidade de água nas três condições de temperaturas testadas, mesmo que logo após atingir o teor de água de 46%, fosse necessária nova adição para manutenção desta porcentagem, a mesma não foi realizada. A dosagem de ácido giberélico foi feita (AG) na concentração de  $0,2\text{mg kg}^{-1}$  em todas as amostras e na germinação foram testadas três condições de temperatura: - teste 1: 36h com temperatura em  $22^{\circ}\text{C}$ , 6h para baixar de  $22^{\circ}\text{C}$  para  $17^{\circ}\text{C}$  e 78h com temperatura em  $17^{\circ}\text{C}$ , totalizando 120h (cinco dias); teste 2: 120h com temperatura em  $16^{\circ}\text{C}$  e teste 3: 120h com temperatura em  $19^{\circ}\text{C}$ .

Em cada teste foram avaliadas amostras das quatro cultivares do segundo (48h) ao quinto dia (120h) de germinação para a atividade das  $\beta$ -glucanases e a concentração de  $\beta$ -glucanos. Assim, as amostras que eram retiradas a cada dia de germinação passavam pelo processo de secagem em estufa, para posterior moagem dos grãos e obtenção da farinha do malte, necessária para as análises. Apenas as sementes retiradas no quinto dia totalizaram o processo de germinação de 120h, sendo que o processo de secagem constou de 20 minutos para elevação da temperatura ambiente até  $55^{\circ}\text{C}$  e, uma vez atingida essa temperatura, ela foi mantida por mais 60 minutos. Posteriormente, durante 60 minutos, elevou-se gradualmente a temperatura de  $55$  para  $65^{\circ}\text{C}$  e o material foi mantido nesta temperatura por mais 720 minutos, finalizando o processo.

A atividade das enzimas  $\beta$ -glucanases foi analisada através de espectrofotometria, utilizando-se o kit comercial *Azo-Barley-Glucan* (Megazyme Ltd., Irlanda) (McCLEARY & SHAMEER, 1987), segundo as modificações sugeridas por ZWICKERT-MENTEUR et al. (1996). A atividade enzimática foi expressa em U  $\text{kg}^{-1}$  de malte seco, onde U é a Unidade Internacional de atividade enzimática, sendo que uma unidade (U) de atividade é a quantidade de enzima que libera um micromol de açúcar reduzido por minuto sob as condições definidas de temperatura e pH ( $30^{\circ}\text{C}$  e pH 4,6 neste ensaio); para cada amostra, as medidas foram feitas em duplicata.

Os  $\beta$ -glucanos foram avaliados pelo método fluorimétrico por fluorescência, conforme as normas analíticas EBC, utilizando o equipamento  $\beta$ -glucan 5700 analyser, o qual se baseia na reação entre o calcofluor com os  $\beta$ -glucanos de alto peso molecular, a qual gera

fluorescência analisada na faixa ultravioleta e avaliada mediante a interpolação em uma curva de calibração construída a partir de um padrão reconhecido de  $\beta$ -glucanos. A concentração de  $\beta$ -glucanos foi expressa em  $\text{mg L}^{-1}$  e, para cada amostra, as medidas foram realizadas em duplicata. Como parâmetro de referência, a indústria malteira tem a especificação de utilizar maltes com valores de  $\beta$ -glucanos abaixo de  $180\text{mg L}^{-1}$ , mas pode trabalhar com valores acima deste ideal.

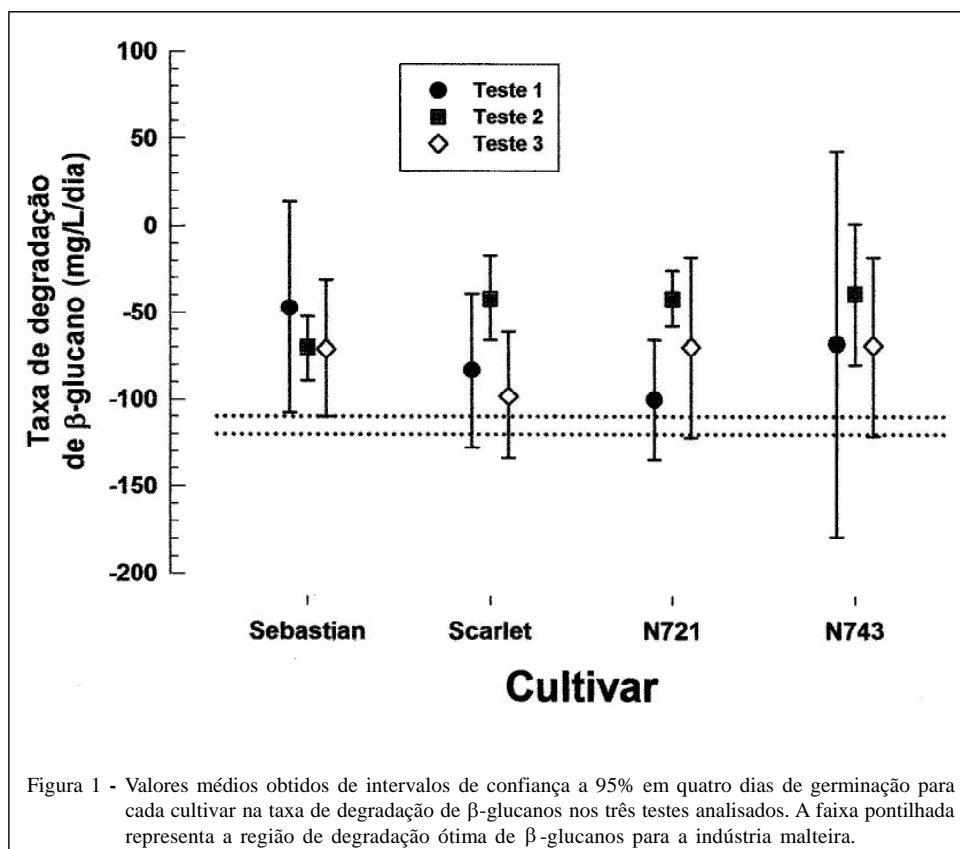
Como a característica final de qualidade do malte que se busca obter é a baixa concentração de  $\beta$ -glucanos, uma vez que a mesma representa a efetiva atividade das enzimas  $\beta$ -glucanases, foi feita a análise de regressão linear simples (com intervalo de confiança de 95%) considerando-se a taxa de degradação de  $\beta$ -glucanos, ou seja, os valores de  $\beta$ -glucanos obtidos foram utilizados para calcular o quanto de  $\beta$ -glucanos era modificado pela atividade enzimática a cada dia de germinação, para cada condição de temperatura testada. Dessa forma, tornou-se possível verificar se existiriam diferenças significativas na atividade das  $\beta$ -glucanases, nas cultivares analisadas, cujo programa utilizado foi SPSS, versão 17.0.

Para interpretação dos resultados, foi considerado que uma adequada concentração final de  $\beta$ -glucanos no malte seria em torno de  $100\text{mg L}^{-1}$ , apesar da especificação industrial aceitar níveis superiores, pois, dessa forma, seria possível determinar quais cultivares que realmente se aproximavam de um valor ideal. Considerando os valores iniciais de  $\beta$ -glucanos das amostras (segundo dia), próximos a  $400\text{mg L}^{-1}$ , a faixa ótima de degradação de  $\beta$ -glucanos estaria em torno de  $-110$  a  $-120\text{mg L}^{-1}$  dia<sup>-1</sup> (Figura 1).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a cultivar Sebastian, foi observado o maior valor médio de atividade enzimática de todas as análises, ao final de 120 horas de germinação no teste 2, com valor de  $926,95\text{U kg}^{-1}$ . Nesta cultivar, os valores finais para a concentração de  $\beta$ -glucanos foram altos e similares nas três condições de temperatura testadas, enquanto a menor concentração final foi observada no teste 1, porém ainda considerada alta ( $253\text{mg L}^{-1}$ ) (Figura 2 a, b, c).

Os valores de atividade na cultivar Scarlet foram superiores a  $800\text{U kg}^{-1}$  ao final do processo, nas três condições de temperatura testadas, demonstrando ser uma variedade com um alto poder enzimático, com o melhor resultado observado no teste 1 (média de  $852,61\text{U kg}^{-1}$ ). Para a concentração de  $\beta$ -glucanos, os melhores resultados foram observados nos testes 1 e 3, com



valores de 185 e 187 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. No teste 2, a concentração de β-glucanos manteve-se elevada (325 mg L<sup>-1</sup>) mesmo com uma considerável atividade enzimática.

Ao final do processo de malteação, a cultivar N721 expressou maior atividade enzimática nas condições de temperatura do teste 1 (média de 870,88 U kg<sup>-1</sup>) e a menor foi observada na temperatura do teste 3, com 535,09 U kg<sup>-1</sup>. Para essa cultivar, observou-se o melhor resultado quanto à degradação de β-glucanos de todas as análises, com o valor final de 112 mg L<sup>-1</sup> no teste 1. Nas condições de temperatura dos testes 2 e 3, a concentração de β-glucanos manteve-se um pouco elevada, acima dos 200 mg L<sup>-1</sup>.

Para a cultivar N743, diferentemente do observado para as demais cultivares, ocorreu o mais alto valor de atividade enzimática na condição de temperatura do teste 3 (818,59 U kg<sup>-1</sup>) e este valor foi atingido por uma rápida elevação na atividade entre as 96 e 120 horas finais do processo. Quanto à concentração de β-glucanos, os valores mantiveram-se elevados ao final do processo, nas três condições de temperaturas testadas, sendo o melhor resultado (214 mg L<sup>-1</sup>) observado com a temperatura do teste 1.

Entre as três condições testadas, verificou-se que a temperatura utilizada no teste 1 foi a mais eficiente no desenvolvimento de atividade enzimática e efetiva degradação de β-glucanos para a maioria das cultivares. Essa situação foi observada desde o segundo dia de germinação, cuja atividade enzimática das cultivares Sebastian, N721 e N743 foi mais alta do que quando germinadas nas condições de temperatura dos testes 2 e 3. Também nos resultados obtidos ao final do processo, as cultivares Scarlet e N721 demonstraram valores de atividade enzimática superiores a 800 U kg<sup>-1</sup>, sendo que, para a cultivar N721, nessa condição de temperatura, observou-se o melhor resultado de degradação de β-glucanos de todas as análises, com valores abaixo de 200 mg L<sup>-1</sup>, inclusive nas 96 horas iniciais de germinação.

As condições de temperatura utilizadas no teste 1, com 36h iniciais a 22°C e com decréscimo para 17°C para o tempo restante da germinação, provavelmente favoreceram o desenvolvimento das variáveis estudadas. Segundo TOFFOLI et al. (2003), uma temperatura mais elevada utilizada apenas no início do processo de germinação produziria maltes com maior atividade enzimática e baixa viscosidade. Por outro lado,

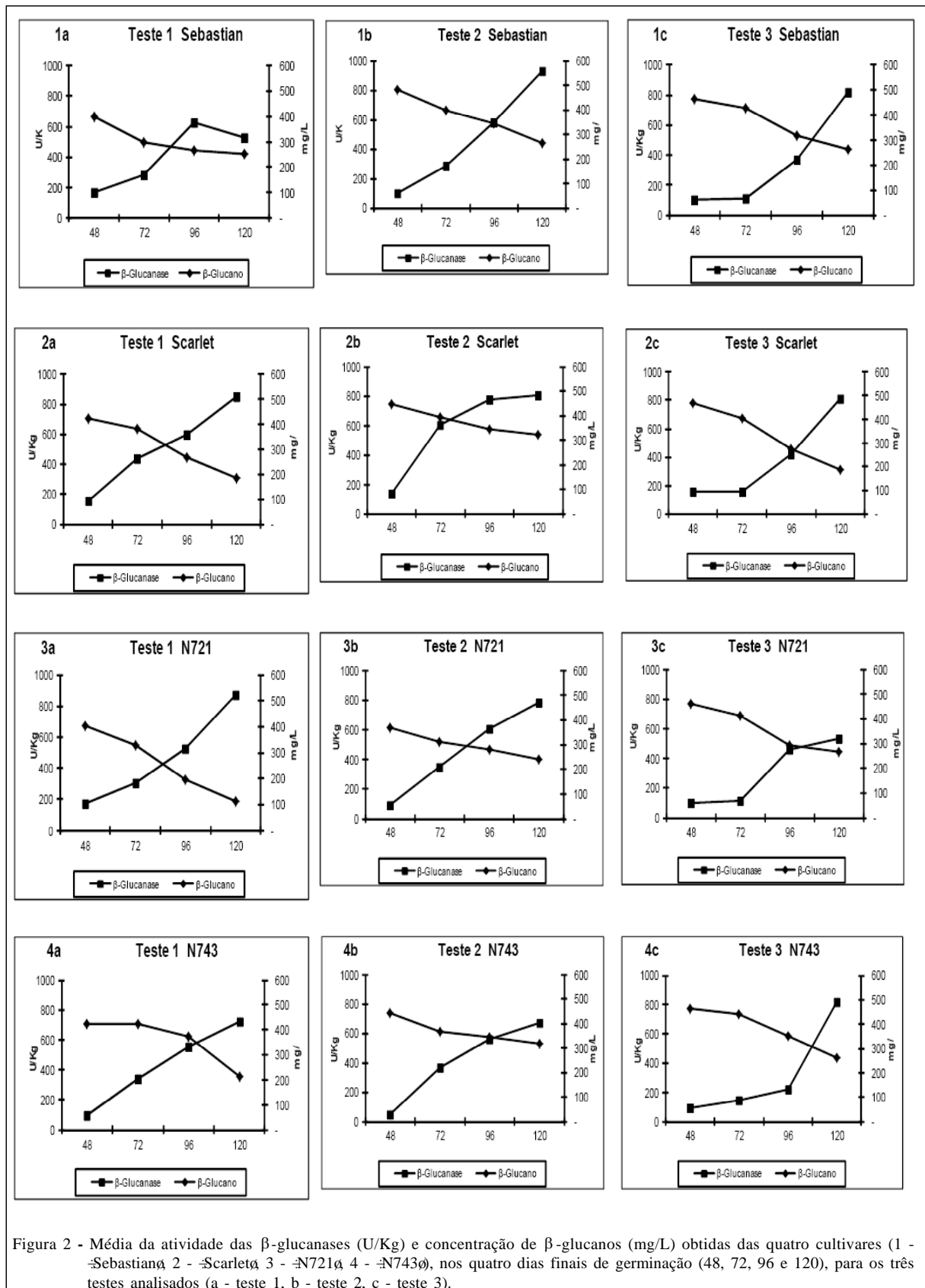


Figura 2 - Média da atividade das  $\beta$ -glucanases (U/Kg) e concentração de  $\beta$ -glucanos (mg/L) obtidas das quatro cultivares (1 - Sebastian, 2 - Scarlet, 3 - N721, 4 - N743), nos quatro dias finais de germinação (48, 72, 96 e 120), para os três testes analisados (a - teste 1, b - teste 2, c - teste 3).

se altas temperaturas forem empregadas em todo o processo de malteação, poderia ocorrer uma modificação rápida, porém não uniforme no grão. Após o efeito indutor inicial, observar-se-ia uma queda na atividade das  $\beta$ -glucanases, amilases e proteases, antes da finalização do processo, resultando em baixa produção de extrato e nitrogênio solúvel, enquanto a viscosidade permaneceria alta (BAXTER & O'FARRELL, 1980; BRIGGS, 1998).

Como explicado anteriormente, até completar três dias de germinação, foi adicionada água aos grãos de cevada em quantidade suficiente para que atingissem umidade em torno de 46% e o efeito da temperatura utilizada durante a germinação também foi observado durante esse procedimento. A quantidade de água adicionada foi bem absorvida pelos grãos na temperatura do teste 1, pois, para aqueles germinados nas condições do teste 2 (16°C), verificou-se dificuldades para absorção de água, provavelmente por estarem iniciando mais lentamente seu metabolismo de germinação porque a temperatura utilizada foi mais baixa.

Para os grãos germinados nas condições do teste 3 (19°C), a água adicionada pareceu ser insuficiente para a manutenção da umidade a 46%, uma vez que ela foi rapidamente absorvida, indicando um metabolismo inicial acelerado. Entretanto, a falta de uma umidade ideal para a germinação pode ter ocasionado a indução mais lenta da atividade enzimática, observada ao longo da germinação, para as quatro cultivares analisadas (Figura 2). Dessa forma, mesmo as cultivares

com alta atividade enzimática ao final do processo, como para as cultivares -Sebastianø e -N743ø altas concentrações finais de -glucanos foram observadas.

Os dados obtidos neste trabalho refletem a importância de se avaliar tanto a atividade das -glucanases como a degradação de -glucanos, pois diferenças na estrutura e/ou uma modificação não uniforme do grão podem levar a interpretações errôneas da qualidade do malte produzido, se apenas a medida da atividade enzimática for avaliada, porque a característica final de qualidade do malte que se busca obter é a baixa concentração de -glucanos.

Na análise de regressão linear simples para a cultivar -N721ø constatou-se a maior taxa de degradação de -glucanos, que foi de  $-100,30 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , nas condições de temperatura do teste 1 (Tabela 1 e Figura 1). Essa taxa de degradação resultou em um valor final de -glucanos de  $112 \text{ mg L}^{-1}$  no quinto dia de germinação (Figura 2), o qual é adequado aos valores exigidos. Nessa mesma cultivar, os valores da taxa de degradação foram bem inferiores nas outras temperaturas testadas. Para a cultivar -Scarletø também houve alta taxa de degradação, que foi de  $-97,50 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , nas condições de temperatura do teste 3. Porém, como nesse teste os valores iniciais de -glucanos (segundo dia) foram mais altos do que os observados no teste 1, provavelmente por problemas comentados anteriormente, a concentração final de -glucanos foi mais alta ( $187 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Figura 2) que a observada para a cultivar -N721ø mas ainda aceitável ao nível industrial.

Tabela 1 - Dados médios obtidos para coeficientes da análise da regressão linear simples, significância e seus intervalos de confiança a 95% na degradação de  $\beta$ -glucanos para as quatro cultivares, nos três testes analisados.

	Cultivar	B	P <sup>a</sup>	-----Intervalo de Confiança a 95%-----	
				Inferior	Superior
Teste 1	-Sebastianø	-47,40	0,080	-108,37	13,57
	-Scarletø	-83,50	0,020	* -128,25	-38,75
	-N721ø	-100,30	0,006	** -134,99	-65,6
	-N743ø	-68,10	0,120	-178,99	42,79
Teste 2	-Sebastianø	-70,40	0,004	** -88,87	-51,93
	-Scarletø	-41,60	0,020	* -66,25	-16,95
	-N721ø	-41,60	0,008	** -57,54	-26,66
	-N743ø	-39,40	0,050	* -80,16	1,36
Teste 3	-Sebastianø	-70,50	0,020	* -110,25	-30,75
	-Scarletø	-97,50	0,008	** -134,35	-60,65
	-N721ø	-69,80	0,029	* -121,89	-17,71
	-N743ø	-69,20	0,029	* -120,88	-17,52

<sup>a</sup>Significância: \*P<0,05, \*\*P<0,01.

Ao se comparar as quatro cultivares nas três condições de temperaturas testadas, observou-se que as cultivares Scarlet e N721 tiveram desempenho inferior de degradação dos  $\beta$ -glucanos na condição de temperatura utilizada no teste 2 (Tabela 1 e Figura 1).

A redução de tempo no processo de malteação é de extremo interesse para a indústria malteira, pois representaria uma otimização no volume de malte produzido e conseqüentemente uma redução de custos de produção. Na presente análise, observou-se que a cultivar N721 nas condições de temperatura do teste 1, apresentava valores utilizáveis de  $\beta$ -glucanos ( $198\text{mg L}^{-1}$ ) desde as 96 horas do processo (Figura 2).

As perspectivas futuras para este trabalho envolvem a avaliação do material com um maior número de medidas para as variáveis estudadas e outras variáveis da qualidade do malte, como FAN (free amido nitrogen), extrato, cor e friabilidade, pois um maior conjunto de informações pode trazer melhores indícios para a avaliação do padrão de modificação do grão.

## CONCLUSÃO

A temperatura utilizada na etapa da germinação artificial influencia na performance de cultivares de cevada de boa qualidade de malteação com relação à produção das enzimas  $\beta$ -glucanases e degradação de  $\beta$ -glucanos.

A utilização de temperatura mais elevada ( $22^\circ\text{C}$ ) no início da germinação, com posterior decréscimo dela para  $17^\circ\text{C}$  é o programa de temperatura mais efetivo para a ativação do metabolismo, síntese e atividade enzimática.

## REFERÊNCIAS

BAXTER, E.D.; O'FARRELL, D.D. Effects of raised temperatures during steeping and germination on proteolysis during malting. **Journal Institute of Brewing**, v.86, p.291-296, 1980.

BRIGGS, D.E. **Malts and malting**. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 796p.

KUNTZ, R.J.; BAMFORTH, C.W. Time course for the development of enzymes in barley. **Journal Institute of Brewing**, v.113, p.196-205, 2007. Disponível em: <<http://www.scientificsocieties.org/4098782E-6027-4464-9EF0-4AFD89C45DB3/>>. Acesso em: 04 mar. 2011.

McCLEARY, B.V.; SHAMEER, I. Assay of malte  $\beta$ -glucanase using azo-barley glucan: an improved precipitant. **Journal Institute of Brewing**, v.93, p.87-90, 1987.

McELROY, D.; JACOBSEN, J. What's brewing in barley biotechnology? **Bio/Technology**, v.13, p.245-249, 1995.

SATO, K. et al. QTL analysis of resistance to the rice blast pathogen in barley (*Hordeum vulgare*). **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, p.916-920, 2001. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/0040-5752/102/6-7/>>. Acesso em: 04 mar. 2011.

TOFFOLI, F. et al. Effects of pulses of higher temperature on the development of enzyme activity during malting. **Journal Institute of Brewing**, v.109, p.337-341, 2003. Disponível em: <<http://www.scientificsocieties.org/jib/papers/2003/G-2003-1309-180.pdf>>. Acesso em: 04 mar. 2011.

WOODWARD, J.R.; FINCHER, G.B. Purification and chemical properties of two 1,3; 1,4- $\beta$ -glucan endohydrolases from germinating barley. **European Journal Biochemical**, v.12, p.663-669, 1982a.

WOODWARD, J.R.; FINCHER, G.B. Substrate specificities and kinetic properties of two (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucan endohydrolases from germinating barley (*Hordeum vulgare*). **Carbohydrate Research**, v.106, p.111-122, 1982b.

ZHANG, G. et al. Cultivar and environmental effects (1-3, 1-4)- $\beta$ -D-glucan and protein content in malting barley. **Journal Cereal Science**, v.34, p.295-301, 2001. Disponível em: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=PublicationURL&\\_cdi=6853&\\_pubType=J&\\_acct=C000037798&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=687304&md5=4dda823406678051cd93604919181dd5&jchunk=34#34](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=PublicationURL&_cdi=6853&_pubType=J&_acct=C000037798&_version=1&_urlVersion=0&_userid=687304&md5=4dda823406678051cd93604919181dd5&jchunk=34#34)>. Acesso em: 04 mar. 2011. doi:10.1006/jcrs.2001.0414.

ZWICKERT-MENTEUR, S. et al. Amy2 polymorphism as a possible marker of  $\beta$ -glucanases activity in barley. **Journal Cereal Science**, v.24, p.55-63, 1996. Disponível em: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=PublicationURL&\\_toctkey=%23TOC%236853%231996%23999759998%23306713%23FLT%23&\\_cdi=6853&\\_pubType=J&\\_auth=y&\\_acct=C000037798&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=687304&md5=c29cbf2db987e8a383c66c263d2b4d5a](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=PublicationURL&_toctkey=%23TOC%236853%231996%23999759998%23306713%23FLT%23&_cdi=6853&_pubType=J&_auth=y&_acct=C000037798&_version=1&_urlVersion=0&_userid=687304&md5=c29cbf2db987e8a383c66c263d2b4d5a)>. Acesso em: 04 mar. 2011.