

UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E TOXICOLOGIA
APLICADA



**RELAÇÃO DOS EFEITOS AMBIENTAIS SOBRE A ATIVIDADE
ENZIMÁTICA DAS (1-3, 1-4)- β -GLUCANASES EM CEVADA**

Dissertação para obtenção do Título
de Mestre em Genética e
Toxicologia Aplicada

MARISTELA DORNELES NUNES

Orientadora: Dra. JANAÍNA ENDRES GEORG-KRAEMER

CANOAS

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Instituições onde o trabalho foi desenvolvido:

- Laboratório da Biodiversidade Vegetal – ULBRA. Canoas, RS
- Centro de Laboratórios do prédio 19 – ULBRA. Canoas, RS
- Laboratório de Análises - Maltaria Navegantes – AmBev. Porto Alegre, RS
- Embrapa – Trigo. Passo Fundo, RS
- Estação Experimental de Guarapuava - Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária. Guarapuava, PR

Fontes Financiadoras:

- Companhia Brasileira de Bebidas – Filial Maltaria Navegantes – AmBev
- Universidade Luterana do Brasil – ULBRA
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Dedico este trabalho aos meus pais, Artur e Adair, ao meu esposo Edmilson e também ao meu filho Henrique. Meus amigos, companheiros e incentivadores que me impulsionaram a buscar vida nova a cada dia. Meus agradecimentos por terem aceito se privar de minha companhia, trocada pelo estudo e assim, concedendo a mim a oportunidade de me realizar ainda mais.

Agradeço especialmente a Deus, que está sempre ao meu lado, dando-me coragem e perseverança para atingir meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

- A Prof. Dra. Janaína Endres Georg-Kraemer que como orientadora e amiga soube cobrar, mas também não mediu esforços em oferecer todas as condições necessárias à realização do presente trabalho. E que muito contribui para o meu amadurecimento pessoal e profissional com sua valiosa orientação científica. Fica aqui minha eterna admiração, gratidão e amizade.
- A Prof. Dra. Suzana Smith Cavalli, pela ajuda no propósito deste trabalho.
- À Universidade Luterana do Brasil – ULBRA/Canoas e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Toxicologia Aplicada – PPGGTA pela realização do presente trabalho.
- À prof. Tânia Prochnow, ao pessoal do Centro de Laboratórios do prédio dezenove e ao Departamento de Química pelo empréstimo do espectrofotômetro.
- A equipe do laboratório da Maltaria Navegantes pelo auxílio na micromalteação das amostras de cevada.
- À empresa AmBev pelo patrocínio deste trabalho.
- Ao pesquisador Euclides Minella da Embrapa - Trigo (Passo Fundo) pelo plantio e fornecimento das sementes.
- Ao pesquisador Noemir Antoniazzi da Cooperativa Agrária Mista Entre Rios Ltda. Guarapuava, PR, pelo plantio, cuidado do material e pela atenção em nos fornecer dados da região.

- A todos os professores do Curso de Mestrado em Genética e Toxicologia Aplicada, que de uma forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.
- Aos amigos, pelo apoio técnico e moral recebido durante o desenvolvimento desse trabalho.

ÍNDICE

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Material	18
3.2 Métodos	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

RESUMO

Como outras características da qualidade do malte, as (1-3, 1-4)- β -glucanases presentes na cevada malteada dependem tanto dos efeitos genotípicos como dos ambientais. O objetivo deste trabalho foi relacionar os efeitos do ambiente sobre os diferentes genótipos pertencentes a uma população duplo-haplóide (DH) de cevada brasileira com relação à atividade enzimática das (1-3, 1-4)- β -glucanases. Foi estudada uma população com 56 linhas DHs, segregantes quanto a atividade das (1-3, 1-4)- β -glucanases no malte seco. Estas linhas foram semeadas e colhidas em três locais distintos, nos anos de 2002, 2003 e 2005. As sementes de cada linha DH foram micromalteadas e a atividade medida.

A análise da variância da atividade das (1-3, 1-4)- β -glucanases no malte seco mostrou efeitos significativos para local, genótipo, ano e interação genótipo-ambiente. Em todos os locais e anos, houve um maior número de linhas que mostraram baixos valores de atividade, sendo esta tendência menos acentuada somente em Passo Fundo, no ano de 2002. Os efeitos climáticos podem ter afetado o desempenho das linhas DHs, em Passo Fundo, nos dois últimos anos comparados no presente estudo (2003 e 2005), pois algumas linhas não demonstraram o mesmo desempenho de produção de atividade enzimática que tiveram no ano de 2002, onde o conjunto de fatores ambientais parece ter permitido a produção de alta atividade enzimática (interação genótipo-ambiente).

A herdabilidade da atividade das (1-3, 1-4)- β -glucanases no malte seco para esta população estudada foi de $h^2 = -0,74$. Apesar, do valor obtido, representar uma baixa herdabilidade para a característica analisada, um resultado negativo não seria esperado, pois a herdabilidade é avaliada entre valores que variam de 0 a 1. Este valor negativo deve ser considerado zero e pode ser uma consequência do tamanho da população DH estudada que é relativamente pequeno e dos dados de atividade obtidos nos diferentes anos.

Estes resultados indicam forte influência ambiental para a característica estudada, confirmando os dados da literatura. Esta situação deve ser levada em conta em programas de melhoramento.

ABSTRACT

Like other malt quality characteristics, (1-3, 1-4)- β -glucanases present in malted barley are dependent on both genotypic and environmental effects. The objective of this work was to list the environmental effects on distinct genotypes belonging to one double-haploid population of Brazilian barley with regard to the (1-3, 1-4)- β -glucanases enzyme activity. A DH population with 56 segregating lines with regard to the (1-3, 1-4)- β -glucanases in kilning malt was studied. The seeds of each DH line were grown in three distinct sites, in the years 2002, 2003 and 2005. The seeds of each DH line were malted and the enzyme activity measured.

Variance analysis of the (1-3, 1-4)- β -glucanases activity in dry malt revealed significant effects of local, genotype, year, and genotype-environment interactions. In all locals and years, a greater concentration around the less elevated activity values was observed, this tendency being lower only in Passo Fundo, in 2002. The climatic effects may have affected the performance of DH lines in Passo Fundo in the last two years compared in the present study (2003 and 2005), since some lines did not show the same performance in the generation of enzyme activity as occurred in 2002, when the set of environmental factors seems to have allowed the high enzyme activity (genotype-environment interaction).

The heritability of (1-3, 1-4)- β -glucanases activity in dry malt for the population analyzed was $h^2 = -0,74$. Although the value obtained represented a low heritability for the characteristic analyzed, a negative result was not expected, since heritability is assessed as values lying between 0 and 1. This negative value may be considered zero and can be a consequence of the DH population size studied, which could be interpreted as small, and of the activity data obtained in the different years of the study.

This results suggest strong environmental influence for the characteristic studied, corroborating previous results. This situation should be considered in breeding programs.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a comercialização da cevada (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* L.) sempre esteve relacionada a fins cervejeiros, sendo baixa a percentagem de seu uso para a alimentação humana e ração animal. Os principais estados produtores de cevada cervejeira no Brasil são o Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná e, mais recentemente, a região do cerrado brasileiro tem utilizado a cevada como uma opção de cultura de inverno.

Atualmente, no Rio Grande do Sul, cerca de 55 mil hectares estão sendo cultivados com cevada, sendo que a maior parte das lavouras está localizada no Norte do Estado, especialmente entre os municípios de Ibirubá e Vacaria. Para o ano de 2007 a expectativa de colheita é de 260 mil toneladas deste cereal. Mesmo assim, o Brasil continua sendo um grande importador deste produto. Atualmente, cerca de 40% dos grãos, utilizados nas três maltarias brasileiras, são importados de países do Mercosul e também da Europa. Os grãos de cevada utilizados na indústria cervejeira devem atender a um padrão técnico que incluem índice de germinação acima de 95%, teor de proteínas abaixo de 12%, uniformidade e tamanho do grão, espessura da casca, cor e cheiro do grão (MINELLA, 2007).

Briggs (2002) ressalta a importância de Horace Taberner Brown em sua notável contribuição à ciência e à prática de preparação da cerveja. Idéias de 1890 a respeito das origens das enzimas que catalisam a modificação do endosperma durante a germinação da cevada e como essas alterações progridem através do grão, formuladas por este pesquisador há 116 anos atrás, até hoje norteiam muitas pesquisas sobre o processo de malteação e como este pode ser melhorado.

O processo de malteação envolve a embebição dos grãos de cevada, germinação, secagem ao forno e envelhecimento do malte. Os objetivos da malteação são: a hidratação e a solubilização de matrizes protéicas do

endosperma e a produção de enzimas para a malteação. Em resumo, o processo induz a germinação, a interrupção do crescimento e o envelhecimento do malte (MCELROY; JACOBSEN, 1995).

Durante a embebição ocorre a iniciação do metabolismo celular e a indução da hidratação do endosperma. O grão de cevada é embebido em água para remover o dióxido de carbono, repor o oxigênio e dissipar o calor. A embebição induz o alongamento celular e a respiração no embrião, estimula a atividade secretora do embrião e a ativação de enzimas. Durante este processo, o conteúdo de umidade do grão aumenta de 10-15% para 42-46%, com simultâneo aumento do volume do grão de aproximadamente 25%. Este é um processo que envolve períodos de contato com a água e períodos de aeração, os quais servem para a ativação do metabolismo celular. A determinação do programa de tempo desses períodos dependerá principalmente do genótipo das cultivares e do período do ano, o qual influi na temperatura da água utilizada no processo (McELROY; JACOBSEN, 1995).

A germinação é um processo em que os grãos de cevada sofrem transformações bioquímicas sob condições controladas de ventilação, umidade e temperatura. Ela inicia quando o conteúdo de umidade atinge a proporção de 30% no grão. A germinação é a fase de crescimento controlado, após a embebição e antes da secagem ao forno. Diferentes critérios são utilizados pelas indústrias malteadoras para determinar o término desta fase. Pode-se, por exemplo, utilizar o surgimento da primeira folha ou ter um período de tempo pré-estabelecido para as cultivares. Os grãos germinados são referidos como malte verde. As β -glucanases são sintetizadas nesta fase, porém, podem ser desnaturadas durante a etapa de secagem da malteação.

A interrupção do crescimento acontece pela secagem em estufa. Nesta etapa acontecem modificações internas na plântula e redução da umidade do malte, para subsequente estocagem. É durante a secagem que ocorrerá a fixação das características do malte, como a cor e o sabor. O processo de secagem é regulado para reduzir a umidade do grão para 3-5%, mas ao mesmo tempo deve assegurar a manutenção da atividade de enzimas hidrolíticas, como as (1-3, 1-4)-

β -glucanases, proteases e outras enzimas de malteação que serão necessárias para o processo de fabricação da cerveja.

O envelhecimento do malte permite um balanceamento lento e difuso da umidade dentro do grão. Após esta fase o malte está pronto para ser comercializado e utilizado na fabricação da cerveja (McELROY; JACOBSEN, 1995).

Vários fatores podem influenciar o processo de malteação: (SÁ; PALMER, 2005):

- a) Condições de embebição, influenciada pela umidade e temperatura;
- b) Quantidade de água absorvida e sua distribuição no grão durante a embebição e a germinação, o que está relacionado com a composição e a estrutura do endosperma, bem como com o tamanho e a forma do grão;
- c) Germinação desigual, que está relacionada com a viabilidade do embrião;
- d) Produção de ácido giberélico pelo embrião;
- e) Transporte ativo de ácido giberélico através da aleurona;
- f) Resposta da aleurona ao ácido giberélico, o que inicia a produção das enzimas com ação de degradação do endosperma;
- g) Distribuição de enzimas através do endosperma, o que é controlado pela estrutura do endosperma.
- h) Propriedades físico-químicas dos β -glucanos e proteínas de armazenamento das paredes celulares do endosperma.

Entre as várias enzimas que desempenham atividades importantes no processo de malteação, as (1-3, 1-4)- β -glucanases são as primeiras a agirem. No começo da germinação da cevada ocorre o rompimento das paredes celulares do endosperma amiláceo pelas enzimas (1-3, 1-4)- β -glucanases e outras hidrolases permitindo o acesso das α -amilases, proteases e outras enzimas aos seus substratos dentro da célula do endosperma. As (1-3, 1-4)- β -glucanases hidrolisam os (1-3, 1-4)- β -D-glucanos, um polímero linear de glicose ligado por pontes β -(1-4) e β -(1-3), o principal componente das paredes da célula do endosperma da

cevada. Elas agem especificamente sobre as ligações β -(1-4), mas somente se houver um resíduo (1-3)- β -glicosil não reduzido na extremidade do extrato (WOODWARD; FINCHER, 1982).

Foram caracterizadas duas isoenzimas para as (1-3, 1-4)- β -glucanases da cevada. Uma é codificada pelo gene *Glb1*, localizado no cromossomo 5, e outro pelo gene *Glb2*, localizado no cromossomo 1 (WOODWARD; FINCHER, 1982; BRUNSWICK et al., 1987; LITTS et al., 1990). É sugerido que a expressão dos genes das (1-3, 1-4)- β -glucanases deva estar sob controle temporal e seja tecido específica, sendo suas isoenzimas detectadas primeiramente no escutelo, após um dia de germinação, e a partir do segundo dia principalmente na camada de aleurona (McFADDEN et al., 1988). As duas isoenzimas das (1-3, 1-4)- β -glucanases apresentam acentuada diferença em sua termoestabilidade. Deste modo, no malte seco praticamente só permanece a forma termoestável, *Glb2*.

A degradação ineficiente das paredes celulares do endosperma prejudica a difusão das enzimas de germinação, a mobilização de reservas do grão e, em decorrência, reduz o extrato do malte. β -glucanos residuais podem também levar a um aumento na viscosidade e turbidez do mosto e da cerveja, aumentando os problemas de filtração nas cervejarias (SPEERS et al., 2003).

Rompida a parede das células do endosperma, várias enzimas podem penetrar nas células deste tecido, promovendo a conversão do amido a açúcares fermentáveis, principalmente maltose e glicose. Sementes de cevada em germinação contêm quatro carboidrolases responsáveis pela quebra dos grãos de amido. As α -amilases (1-4- α -D-glucano glucanoidrolase, EC 3.2.1.1) e as β -amilases (1-4- β -D-glucano maltoidrolase, EC 3.2.1.1) liberam maltose dos grãos de amido endo e exoliticamente, respectivamente. As dextrinases-limite (amilopectina 6-glucanoidrolase, EC 3.2.1.41), também conhecidas como enzimas ramificadoras ou pululanases, removem os pontos α -(1-6) da ramificação, endoliticamente. Por último, as α -glucosidases, (α -D-glucosidase glucoidrolase, EC 3.2.1.20) liberam glicose dos dissacarídeos, exoliticamente.

Acredita-se que as α -amilases sejam as únicas enzimas que iniciam a hidrólise dos grânulos de amido intactos. A desramificação e a degradação das

maltodextrinas resultantes e dos dímeros solúveis são completadas pelas β -amilases, dextrinases-limites, α -glucosidases. Estas enzimas são coletivamente conhecidas como “diastases” e sua ação, como “poder diastático” (McELROY; JACOBSEN, 1995). As α -amilases são endo-enzimas que clivam ligações α -(1-4) entre resíduos de glicose e são os principais agentes da hidrólise do amido durante a germinação. As β -amilases da cevada catalisam a liberação de β -maltose da extremidade de cadeias não reduzidas de amido e compostos relacionados (MacGREGOR, 1996), o que as torna as proteínas mais importantes do endosperma da cevada. Estas enzimas estão concentradas na sub-camada de aleurona (SHEN-MILLER et al., 1991). As enzimas dextrinases-limite catalisam a hidrólise de ligações intercadeias α -(1-6)-D-glicosídicas em α -dextrinas, as quais resultam da degradação α -amilolítica da amilopectina. As α -glucosidases estão envolvidas na conversão de maltose à glicose durante a malteação. A glicose é um açúcar que pode ser assimilado e metabolizado pelo embrião (MacGREGOR, 1996). A atividade das α -glucosidases e os níveis do seu mRNA aumentam quando ocorre a germinação. É sugerida uma atividade sinérgica entre a α -glucosidade e a α -amilase, devido à remoção, pela α -glucosidase, de subunidades de glicose em junções ramificadas, a qual poderia representar uma barreira física para as α -amilases, ou através da hidrólise de maltose e maltodextrinas que inibem a atividade das α -amilases.

Enzimas proteolíticas também desempenham uma função chave durante a germinação, uma vez que proteínas insolúveis e proteínas de reserva do endosperma da cevada devem ser convertidas em proteínas solúveis, peptídeos e aminoácidos para fornecer nutrientes para o desenvolvimento do embrião. Estas mesmas mudanças são também importantes no processo de malteação porque elas levam à destruição da matriz protéica, liberação de grânulos de amido e formação de aminoácidos no malte que são necessários para a nutrição da levedura durante a fabricação da cerveja (MacGREGOR, 1996).

As lipoxigenases são umas das primeiras enzimas da rota de oxidação e catalisam a hidroperoxidação de ácidos gordurosos poli-insaturados, contendo o sistema 1,4-pentadieno - cis,cis em seus correspondentes hidroxiperóxidos (MacGREGOR, 1996). Este processo conduz à formação de vários metabólitos

secundários, incluindo alguns compostos carbonil que podem contribuir para o “choco” da cerveja e para a perda de sabor (“off-flavor”). Vários métodos têm sido propostos para controlar e reduzir a atividade das lipoxigenases em diferentes estágios da malteação e no processo de fabricação da cerveja, principalmente a seleção de cultivares com baixos níveis destas enzimas (McELROY; JACOBSEN, 1995; MacGREGOR, 1996; WU et al., 1997).

A seleção de cultivares de cevada com baixo conteúdo de β -glucanos é um dos principais objetivos dos programas atuais de melhoramento da cevada cervejeira. Mas esta redução de β -glucanos só pode ser efetuada em uma extensão limitada, uma vez que os mesmos são componentes essenciais da parede celular do endosperma (AHOKAS; NASKALI, 1990; McELROY; JACOBSEN, 1995). Outras áreas têm mostrado possibilidades para aumentar a hidrólise de β -glucanos através de engenharia genética elevando a quantidade das enzimas ou a estabilidade das mesmas ao calor. Buckow et al. (2005) sugeriram o uso de alta pressão hidrostática como alternativa para a preservação térmica das (1-3, 1-4)- β -glucanases, encontrando significativa estabilização a 400MPa (medida de pressão de Pascal). Entretanto, a melhor alternativa é ainda a seleção de cultivares com alta atividade das (1-3, 1-4)- β -glucanases, garantindo a redução dos β -glucanos durante a malteação.

A atividade das (1-3, 1-4)- β -glucanases é uma característica quantitativa, como também são várias outras características agronomicamente importantes, tais como resistência a doenças e a estresses, produção de grãos e outros fatores importantes para a qualidade da malteação. Estas características quantitativas são controladas pela expressão e, geralmente, pela interação de um conjunto de genes (HAYES et al., 1993; MATHER et al., 1997; SATO et al., 2001). Esses genes são chamados de poligenes – genes de características complexas ou locos de caracteres quantitativos (QTL – “Quantitative Trait Loci”). A expressão dessas características geralmente sofre forte influência ambiental.

Para o melhorista e o produtor é interessante trabalhar com genótipos que tenham estabilidade ou sutis influências ambientais, nas suas características agrônômicas, em uma variedade de ambientes. Grande parte dos estudos das

características envolvidas com a qualidade do malte são direcionados para a determinação do efeito do genótipo e do ambiente para aquela característica final que se observa. Para algumas características foi observado um maior componente genético atuando, como foi detectado para o poder diastático, extrato do malte (EAGLES et al., 1995) e β -glucanos (HENRY, 1986; MOLINA-CANO et al., 1997; ZHANG et al., 2002). Já Lehtonen e Aikasalo (1987), Narasimhalu et al. (1995); Perez-Vendrel et al. (1996) e Molina-Cano et al. (2002) encontraram que para β -glucanos os fatores ambientais são os principais componentes atuando na expressão desta característica, assim como para a capacidade de embebição e concentração de proteína no grão (ZHANG et al., 2001). Fox et al. (2007), verificaram que para a característica “dureza do grão” tanto o genótipo como o ambiente influenciam da mesma forma tal característica.

A construção de populações duplo-haplóides é uma ferramenta que tem sido amplamente utilizada para a avaliação de efeitos ambientais por proporcionar a análise de um mesmo genótipo em diferentes ambientes (STAUB et al., 1996). As linhas duplo-haplóides são completamente homozigotas e homogêneas o que permite verificar se sua resposta com relação a uma característica agrônômica é afetada por uma variedade de condições ambientais as quais as mesmas podem ser expostas (KACZMAREK et al., 1999).

2. OBJETIVOS

Em decorrência da grande importância da atividade das (1-3, 1-4)- β -glucanases no processo de malteação da cevada cervejeira e da provável influência que o ambiente pode ter sobre as mesmas, o presente projeto tem como objetivos específicos:

1. Relacionar os efeitos do ambiente sobre os diferentes genótipos pertencentes a uma população duplo-haplóide de cevada brasileira com relação à atividade enzimática das (1-3, 1-4)- β -glucanases.

2. Contribuir para o melhoramento da cevada cervejeira.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Foi analisada uma população de 56 linhas duplo-haplóides (DHs) desenvolvidas pela Dra. Janaína Endres Georg-Kraemer (Georg-Kraemer, 2004). Estas linhas DHs foram obtidas a partir da cultura *in vitro* de anteras das plantas F₁ obtidas do cruzamento entre duas variedades brasileiras de cevada, contrastantes, em relação à atividade das (1-3, 1-4)- β -glucanases no malte seco: Embrapa 127 (com alta atividade enzimática) e CEV 96025 (com baixa atividade). A origem das variedades parentais é apresentada na tabela 1.

Cada linha DH foi obtida, então, a partir de um único micrósporo (célula sexual masculina), o qual deu origem a uma planta, após as diferentes etapas da cultura de tecidos. As sementes produzidas por esta planta formam uma linha DH, (ou seja, são genotipicamente iguais) e permitiram o plantio, às vezes com repetições, em três locais diferentes.

3.2 MÉTODOS

3.2.1. Plantio das linhas DHs

O plantio da cevada no estado do Rio Grande do Sul começa a ser feito em maio e a colheita das sementes ocorre entre os meses de outubro e novembro. Neste experimento o plantio foi feito em dois blocos. Em cada bloco, cada linha DH foi plantada em fileiras com 20 sementes, com uma distância aproximada de 20 cm entre as sementes. O primeiro bloco foi plantado em ordem, da linha DH 98 à DH 153. Para o segundo bloco foi feito um sorteio para a ordem de plantio. As linhas DHs foram plantadas, no ano de 2002 em Passo Fundo (RS), Víctor Graeff (RS) e Guarapuava (PR). Em Passo Fundo e Víctor Graeff foi semeado um bloco completo e um segundo bloco incompleto, com as linhas DHS plantadas ao acaso, como explicado acima. Em Guarapuava foram plantadas as DHs em apenas uma repetição incompleta (Georg-Kraemer, 2004). Em 2003, as linhas DHs foram semeadas apenas em

Tabela 1. Genealogia das variedades utilizadas como parentais na obtenção da F₁.

Genótipos	Origem
Cultivar	
Embrapa 127	Alexis/BR 2
Linha F₆	
CEV 96025	Stirling/MN 599

Passo Fundo (RS) e com a mesma estrutura de 2002. Em 2005, o plantio foi realizado em Passo Fundo (RS) e Guarapuava (PR) com um bloco completo em um segundo bloco incompleto, com linhas DHs plantadas ao acaso em cada local. As sementes obtidas de cada fileira são reunidas em um “pool” de sementes genotipicamente iguais, o que permite ter quantidade suficiente de sementes para realizar a micromalteação das mesmas e realizar a multiplicação das sementes para a manutenção da linha DH.

Dados sobre os locais estudados, considerando tipo de solo, temperaturas médias mensais máximas e mínimas e as médias pulviométricas mensais são apresentados na tabela 2.

3.2.2. Micromalteação das amostras

A etapa da micromalteação foi realizada entre os meses de abril e maio do ano posterior ao seu plantio. A micromalteação foi realizada na Maltaria Navegantes - AmBev (Porto Alegre). Uma quantidade equivalente a 25g de peso seco de grãos de cada linha DH foi colocada em potes de metal perfurados, os quais foram colocados em um micromalteador, submetendo-se os grãos às seguintes condições de malteação:

- a embebição consistiu em três etapas de contato do grão de cevada com água seguida da retirada da água e aeração. Na primeira etapa os grãos ficaram embebidos por 4h e a aeração ocorreu por 5h. Na segunda etapa, os grãos ficaram embebidos por 2h e novamente aerados por 5h. Na terceira etapa, a embebição foi de 2h e após este tempo as sementes entraram na germinação. A temperatura no processo de embebição foi mantida a $19^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

- a germinação é o segundo passo da malteação, onde as sementes permaneceram por 96h em condições de aeração, a uma temperatura de $16-18^{\circ}\text{C}$.

- a secagem dos grãos ocorreu em seis etapas consecutivas, com um aumento gradual da temperatura: 20 minutos, aumentando da temperatura ambiente até 55°C ; 5h a 55°C ; 5h aumentando de 55°C a 65°C ; 5h a 65°C ; 3h aumentando de 65°C a 82°C ; e 3h a 82°C .

Após a etapa de secagem, o malte obtido de cada linha DH foi moído individualmente em um moedor (Buhler-Miag, Braunschweig, West Germany) com uma granulação de moagem de 0,2mm, obtendo-se assim a farinha de malte.

3.2.3. Análise da atividade das β -glucanases

Após a micromalteação, as amostras foram analisadas quanto à atividade enzimática através de espectrofotometria, de acordo com McCleary e Shameer (1987), utilizando-se o kit comercial “Azo-Barley-Glucan” (Megazyme Ltd., Irlanda). Porém foi utilizada metade da quantidade recomendada para a farinha de malte e todos os reagentes do kit, seguindo assim o protocolo de Zwickert-Menteur et al. (1996).

3.2.4 Procedimentos de análise da enzima

3.2.4.1 Extração da enzima

- a) Foram pesadas 0,25g de farinha de malte, em tubos tipo Falcon de 15ml;
- b) Foram adicionados 4ml de tampão de extração em cada tubo e o material foi agitado;

Tabela 2: Tipo de solo, médias das temperaturas mínimas e máximas mensais (T °C), médias mensais pluviométricas, latitude, longitude e altitude de cada local onde as linhas DHs foram plantadas em 2002, 2003 e 2005. Os dados ambientais foram fornecidos pelo 8° distrito de meteorologia do Rio Grande do Sul / Seoma e estação experimental de Guarapuava/PR.

Local	Tipo de solo	Ano	Clima	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	
Passo Fundo Rio Grande do Sul 28°15'S: 52°24'W Altitude 687m	Latossolo Vermelho Típico Distrófico	2002	T_{\min} (°C)	12,9	9,3	8,6	11,3	9,1	14,8	15,1	16,8	
			T_{\max} (°C)	22,4	18,6	18,2	20,4	20,0	24,1	26,5	27,3	
			Precipitação (mm)	192,4	241,9	146,3	233,8	253,6	372,3	205,0	329,5	
			2003	T_{\min} (°C)	10,1	11,8	8,8	7,5	10,7	13,3	13,7	15,3
				T_{\max} (°C)	21,2	20,9	19,7	19,1	22,6	25,3	26,6	26,6
				Precipitação (mm)	107,3	152,6	100,6	57,5	64,0	237,1	168,2	391,5
			2005	T_{\min} (°C)	12,6	12,7	8,0	10,7	8,9	14,0	15,2	15,8
				T_{\max} (°C)	21,4	20,3	17,7	21,4	17,4	23,7	27,7	27,9
				Precipitação (mm)	317,0	273,1	83,7	135,4	152,7	384,8	146,0	81,6
Víctor Graeff Rio Grande do Sul 28°55'S: 52°74'W Altitude 455m	Latossolo Vermelho Escuro Profundo Distrófico Argiloso	2002	T_{\min} (°C)	12,9	9,3	8,6	11,3	9,1	14,8	15,1	16,8	
			T_{\max} (°C)	22,4	18,6	18,2	20,4	20,0	24,1	26,5	27,3	
			Precipitação (mm)	192,4	241,9	146,3	233,8	253,6	372,3	205,0	329,5	
			2003	T_{\min} (°C)	10,1	11,8	8,8	7,5	10,7	13,3	13,7	15,3
				T_{\max} (°C)	21,2	20,9	19,7	19,1	22,6	25,3	26,6	26,6
				Precipitação (mm)	107,3	152,6	100,6	57,5	64,0	237,1	168,2	391,5
			2005	T_{\min} (°C)	12,6	12,7	8,0	10,7	8,9	14,0	15,2	15,8
				T_{\max} (°C)	21,4	20,3	17,7	21,4	17,4	23,7	27,7	27,9
				Precipitação (mm)	317,0	273,1	83,7	135,4	152,7	384,8	146,0	81,6
Guarapuava Paraná 25°23'S: 51°27'W Altitude 1.100m	Latossolo Típico Bruno Com Alumínio	2002	T_{\min} (°C)	12,1	11,7	8,0	10,9	8,8	14,9	14,2	15,9	
			T_{\max} (°C)	21,1	21,8	19,1	21,4	21,2	25,2	25,3	26,3	
			Precipitação (mm)	245,4	22,8	75,2	144,2	194,4	197,4	239,6	157,4	
			2003	T_{\min} (°C)	10,7	11,2	7,3	9,8	9,3	14,1	13,4	14,2
				T_{\max} (°C)	21,8	20,2	17,9	22,2	17,6	23,3	25,3	26,0
				Precipitação (mm)	156,0	204,0	80,0	108,0	253,0	361,0	59,0	115,0
			2005	T_{\min} (°C)	10,7	11,2	7,3	9,8	9,3	14,1	13,4	14,2
				T_{\max} (°C)	21,8	20,2	17,9	22,2	17,6	23,3	25,3	26,0
				Precipitação (mm)	156,0	204,0	80,0	108,0	253,0	361,0	59,0	115,0

- c) Os tubos Falcon, com material, foram deixados a uma temperatura de 25°C para permitir que ocorresse a extração da enzima, sendo levemente agitados a cada 5 min;
- d) Após este período o material foi centrifugado por 10 min a 2500 rpm;

3.2.4.2 Ensaio da atividade das β -glucanases no malte

- a) De cada amostra centrifugada foi retirado 1ml do sobrenadante, o qual foi colocado em novo tubo;
- b) Foram colocados, para pré-incubar em banho-maria, a 30°C por um período de 5 min;
- c) Foram colocados para pré-incubar também, em outros tubos, 250 μ l da solução de substrato Azo-Barley glucan;
- d) A cada tubo contendo 250 μ l de substrato Azo-Barley glucan foi adicionado uma alíquota de 250 μ l do sobrenadante já incubado. Foram misturados vigorosamente no vortex;
- e) Foram colocados novamente para incubar em banho-maria por mais 10 min a 30°C. Após, foram adicionados 1,5ml de solução precipitante e vigorosamente agitados;
- f) As soluções foram deixadas interagir por mais 5 min;
- g) O material foi centrifugado por 10 min a 2500 rpm;
- h) Foram retirados os sobrenadantes de cada tubo e colocados em cubetas de quartzo para leitura em espectrofotômetro.

3.2.5 Leitura da atividade das β -glucanases em espectrofotômetro:

A leitura da absorbância de cada amostra foi feita em um comprimento de onda de 590nm.

Para cada início de leitura, ou seja, a cada lote de leitura de seis amostras, foi feito um controle. Este controle, também chamado de “negativo”,

consistia numa solução de 250µl de substrato Azo-Barley glucan adicionado de 1,5ml de solução precipitante, os quais foram completamente misturados, para impedir que ocorresse qualquer reação enzimática posteriormente. A essa mistura foram adicionados 250µl do sobrenadante da farinha de malte padrão obtido como no item 3.1.1. Os reagentes foram misturados e centrifugados. O sobrenadante desta centrifugação foi colocado em um cubeta para ter sua absorbância medida. Após, iniciou-se a leitura do negativo e das amostras, sendo que o valor da absorbância deste negativo foi utilizado para zerar o espectrofotômetro, assim a absorbância das amostras, lidas posteriormente, representavam somente a atividade enzimática, pois a absorbância referente aos reagentes presentes na reação já haviam sido descontados.

A farinha de malte padrão foi fornecida no kit e permitiu não só a produção do branco, bem como, um controle da qualidade das medidas que estavam sendo realizadas, pois ela traz indicado o intervalo de valores de absorbância de confiança para uso do kit.

3.2.6 Cálculo da atividade das β-glucanases:

Com os valores de absorbância, a atividade das β-glucanases foi definida em unidades/kilograma:

$$U/kg = M.X + C$$

onde:

M= 630 (inclinação do gráfico de calibração)

X= valor da absorbância

C= 4 (valor de interceptação no eixo de Y)

A atividade das β-glucanases foi expressa em U/kg de malte seco, onde U é a Unidade Internacional de atividade enzimática. Uma unidade (U) de atividade é a quantidade de enzima que libera um micromol de açúcar reduzido, por minuto e sob condições definidas de temperatura e pH (30°C e pH 4,6 neste ensaio).

Para cada amostra os ensaios foram feitos em duplicata e a atividade média foi calculada.

3.2.7 Tampões

A seguir estão citados os tampões utilizados na análise.

- Solução de extração:

acetato de sódio ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) – 5,44g

sódio ortofosfato dihidrogenado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) – 6,24g

azida sódica – 0,2g

Os reagentes foram dissolvidos em 900ml de água destilada. O pH foi ajustado para 4,6 e após o volume ajustado para 1l. A solução foi estocada em geladeira. Esta solução foi fornecida no kit, porém no caso de ser insuficiente para a análise poderia ser produzida no laboratório.

- Solução de substrato Azo-Barley glucan:

Solução de β -glucanos marcados com corante (1% p/v), diluído em azida sódica (0,02%) e quimicamente modificados para aumentar sua solubilidade. Solução fornecida pelo kit.

- Solução precipitante:

acetato de sódio ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) - 40g

acetato de zinco – 4g

Os reagentes foram dissolvidos em 150ml de água destilada e o pH ajustado para 5,0. O volume foi completado para 200ml. A esta solução foram adicionados 800ml de metoxi-etanol. A solução foi estocada a temperatura ambiente.

3.2.8. Análise estatística:

A análise da variância do caráter atividade da enzima foi feita utilizando o programa SAS (SAS INSTITUTE, 1999). Para a população DH a análise da variância foi feita considerando-se os efeitos da repetição, dos locais, dos anos e dos genótipos como aleatórios. A herdabilidade (h^2) foi estimada a partir da σ^2 aditiva / σ^2 fenotípica, onde a σ^2 fenotípica foi calculada com QM_{DH} / n° repetições x anos x n° locais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade das (1-3, 1-4)- β -glucanases é de grande importância para a cevada cervejeira, pois ao degradar os β -glucanos não só diminui a concentração destes compostos indesejáveis para a malteação e fabricação da cerveja, como aumenta a produção do extrato do malte, ao permitir que as enzimas que modificam o amido penetrem nas células do endosperma.

A análise da variância da atividade das (1-3, 1-4)- β -glucanases no malte seco das 56 linhas analisadas mostrou efeitos significantes para local, ano, genótipo (DH) e interação genótipo x ambiente comprovando a atuação do ambiente na característica estudada (tabela 3).

A atividade das (1-3, 1-4)- β -glucanases nos diferentes locais e nos diferentes anos demonstrou tendência a concentrar linhas em torno dos valores menos elevados de atividade (Figura 1a, b e c), sendo esta tendência menos acentuada somente quando consideramos a atividade enzimática obtida em Passo Fundo, em 2002.

A atividade média das β -glucanases das linhas DHs no malte seco, em Víctor Graeff (VG) variou de 35,19 U/kg a 310,18 U/kg (Tabela 4). Em Guarapuava (GUA), em 2002, a variação foi de 42,12 U/kg a 249,70 U/kg e em 2005 de 28,21 U/kg a 126,52 U/kg. Para Passo Fundo (PF) a atividade em 2002 variou de 107,32 U/kg a 1193,85,82 U/kg; em 2003 de 43,21 U/kg a 153,94 U/kg e em 2005 de 28,57 U/kg a 676,68 U/kg, sendo que somente duas linhas mostraram valores tão elevados. Se compararmos os dados obtidos somente em 2002, podemos verificar uma maior atividade enzimática em PF do que nos outros dois locais, com uma atividade média máxima até três vezes maior. Entretanto a diferença de atividade entre os anos é que mais chama a atenção, caindo para a metade em GUA de 2002 para 2005 e visivelmente mais acentuada em PF, pois para os valores máximos da atividade média nos anos de 2003 e 2005 foram quase um sexto daquela encontrada em 2002, sendo que os valores entre 2003 e 2005 foram bastante parecidos neste local. Estas diferenças também podem ser observadas na figura 1.

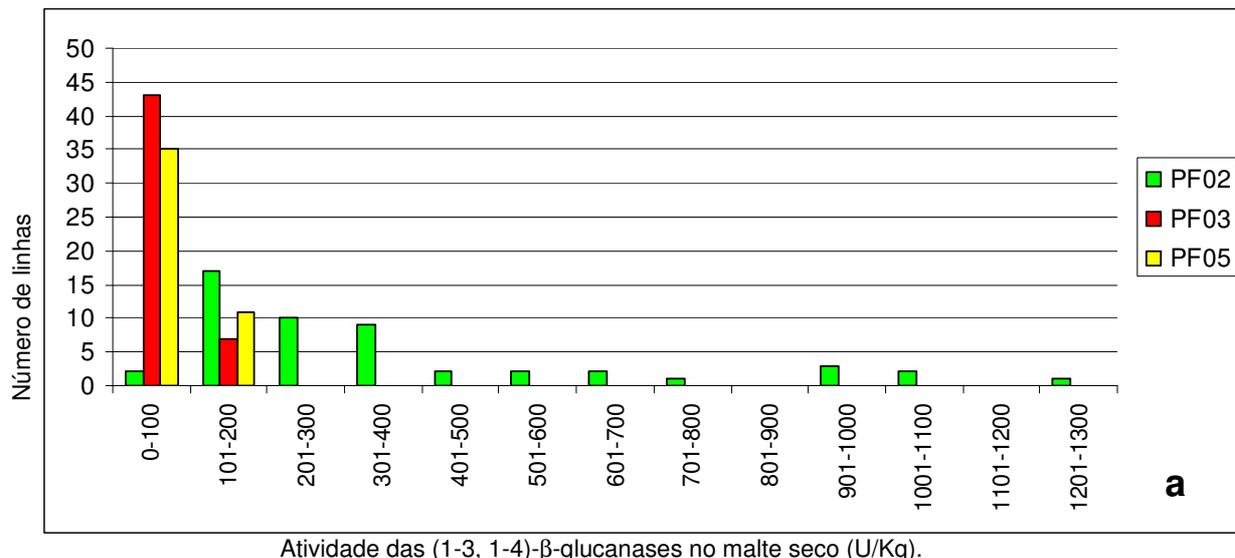
Tabela 3: Análise da variância da atividade das (1-3, 1-4)- β -glucanases no malte seco para as 56 linhas DHs estudadas.

População	Causas da Variação	GL	QM	QME
Malte Seco	Ano	2	906.445,47**	
	Local	2	838.530,75**	
	Repetição	1	39.734,31*	
	DH	54	14.035,28**	$\sigma^2 + r\sigma_{DHxAxL}^2 + rA\sigma_{DHxL}^2 + rL\sigma_{DHxA}^2 + rAL\sigma_{DH}^2$
	DH x Ano	93	25.098,64**	$\sigma^2 + r\sigma_{DHxAxL}^2 + rL\sigma_{DHxA}^2$
	DH x Local	93	22.534,41**	$\sigma^2 + r\sigma_{DHxAxL}^2 + rA\sigma_{DHxL}^2$
	DH x Ano x Local	21	23.119,693**	$\sigma^2 + r\sigma_{DHxAxL}^2$
	Erro		4.455,806**	σ^2

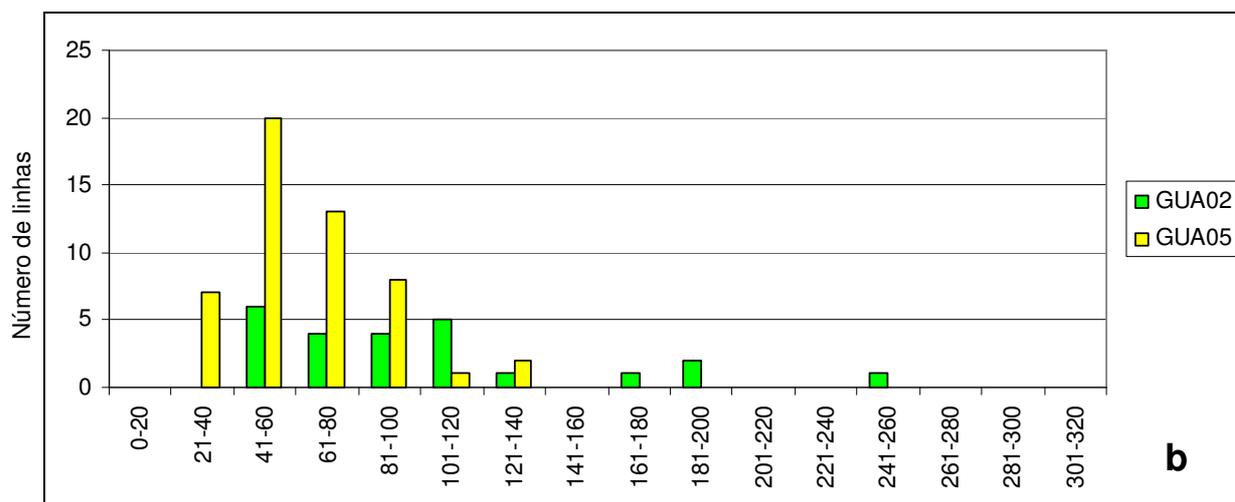
*, ** significativo a 5% e 1% de probabilidade por teste F, respectivamente

Se formos comparar as diferenças ambientais entre os locais estudados, com relação à temperatura não houve muita variação entre locais e anos (tabela 2). Para PF e VG observamos os mesmos índices de precipitação, pois são regiões bastante próximas, sendo que estes locais diferem principalmente com relação ao solo. Já para PF e VG com relação à GUA, temos diferenças tanto de solo quanto de precipitação. Mesmo assim, para o ano de 2002, as DHs crescidas em VG e GUA foram mais semelhantes com relação a atividade enzimática que para PF, provavelmente devido a ação de outros fatores ambientais não avaliados aqui, como por exemplo a formação de geada que pode ter ocorrido em VG e GUA e não em PF. Neste ano, a maior diferença encontrada para precipitação foi um excesso de chuva em PF e VG, nos meses de setembro e outubro e um período de chuvas escassas em GUA nos meses de junho e julho. Em 2003, em PF, uma menor quantidade de precipitação foi encontrada nos meses de agosto e setembro, já em 2005, foi verificado um excesso de chuvas em maio e em outubro, e em GUA, excesso de chuvas em setembro e outubro.

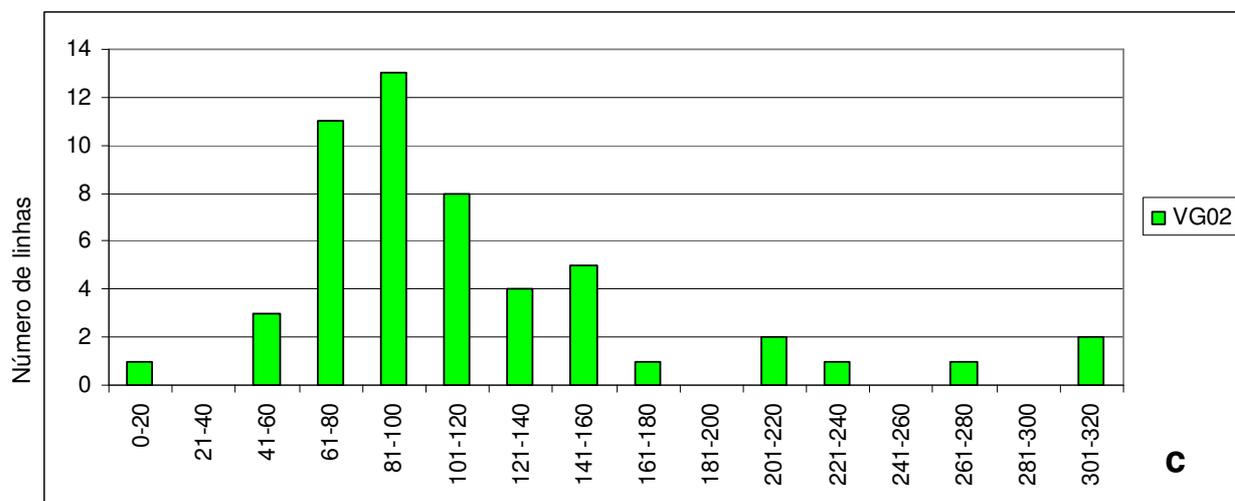
Figura 1: Frequência de distribuição da atividade das (1-3, 1-4)- β -glucanases nas 56 linhas DHs, nos três locais e anos estudados, a=PF, b=GUA e c=VG.



Atividade das (1-3, 1-4)- β -glucanases no malte seco (U/Kg).



Atividade das (1-3, 1-4)- β -glucanases no malte seco (U/Kg).



Atividade das (1-3, 1-4)- β -glucanases no malte seco (U/Kg).

Tabela 4: Médias e limites de atividade das (1-3, 1-4)- β -glucanases, em U/Kg, no malte seco, para as 56 linhas DHs, nos três locais e anos estudados. A média foi obtida a partir da média dos valores das duas repetições, sendo que em cada repetição o ensaio da atividade foi realizado em duplicata. Na tabela a presença do ponto significa que a atividade enzimática não foi medida.

GENÓTIPOS (linha DH)	Média dos valores de atividade e valores limites (U/kg)											
	PASSO FUNDO						VICTOR GRAEFF			GUARAPUAVA		
	2002	limites - n° ensaios	2003	limites - n° ensaios	2005	limites - n° ensaios	2002	limites - n° ensaios	2002	limites - n° ensaios	2005	limites - n° ensaios
98	107,32	(85,90-128,74) - 2	140,04	(135,04-145,04) - 2	65,26	(21,01-112,36) - 4	51,09	(46,21-55,03) - 4	72,98	(60,07-85,90) - 2	50,77	(34,24-67,00) - 4
99	679,06	(668,52-689,61) - 2	64,48	(56,29-71,41) - 4	107,47	(82,75-126,85) - 4	150,16	(114,25-208,12) - 4	42,74	(43,69-41,80) - 2	121,17	(73,93-170,32) - 4
100	174,73	(174,10-175,36) - 2	70,15	(37,39-104,17) - 4	59,54	(41,17-76,45) - 4	64,80	(62,59-67,00) - 2	45,15	(39,28-55,03) - 2	63,53	(58,81-68,25) - 2
101	165,60	(155,20-175,99) - 2	82,59	(71,41-96,61) - 4	66,04	(41,17-91,57) - 4	146,38	(111,10-184,18) - 4	47,79	(41,17-54,40) - 2	126,52	(126,22-126,83) - 2
102	337,49	(161,50-175,99) - 2	123,22	(93,46-150,79) - 4	94,19	(40,95-147,64) - 4	98,19	(64,48-132,52) - 4	42,12	(41,80-42,43) - 2	97,39	(70,76-123,07) - 4
103	304,51	(286,24-322,78) - 2	93,46	(80,86-107,95) - 4	61,01	(57,55-64,48) - 2	85,90	(80,86-90,94) - 2	61,65	(57,55-65,74) - 2	94,40	(62,59-128,11) - 4
104	136,30	(123,70-148,90) - 2	101,34	(99,13-103,54) - 2	71,09	(65,11-76,45) - 4	89,99	(73,93-109,21) - 4	54,50	(54,18-54,81) - 2	51,88	(39,28-65,11) - 4
105	113,31	(112,36-114,25) - 2	88,26	(56,29-122,44) - 4	75,50	(67,63-82,75) - 4	100,71	(94,72-106,69) - 2	249,70	(224,50-274,90) - 2	67,95	(44,32-90,34) - 2
106	999,13	(930,32-1067,94) - 2	96,93	(93,46-94,72) - 4	100,39	(53,14-148,27) - 4	76,92	(75,19-112,99) - 4	171,58	(153,94-189,22) - 2	51,40	(43,06-59,44) - 4
107	274,90	(230,80-319,00) - 2	82,75	(74,56-87,79) - 4	80,70	(64,48-97,87) - 4	114,09	(86,53-142,60) - 4	183,55	(167,17-199,93) - 2	67,94	(62,59-73,30) - 4
108	170,95	(170,32-171,58) - 2	84,33	(61,96-109,24) - 4	93,84	(90,31-97,37) - 2	113,78	(87,16-143,86) - 4	111,95	(55,03-56,92) - 2	97,24	(57,55-134,41) - 4
109	167,17	(133,78-200,56) - 2	74,24	(58,81-88,42) - 4	28,57	(34,87-36,76) - 2	93,30	(27,31-29,83) - 2	63,54	(54,40-72,67) - 2	53,12	(55,03-58,18) - 4
110	383,26	(362,47-404,05) - 2	76,29	(55,66-95,98) - 4	62,27	(60,07-64,48) - 2	90,62	(67,00-114,88) - 4	122,44	(120,55-124,33) - 2	77,55	(43,69-112,36) - 4
111	1043,84	(1024,56-1063,12) - 2	72,34	(56,92-85,27) - 4	45,26	(44,32-46,21) - 2	106,06	(63,22-158,98) - 4	110,16	(102,28-118,03) - 2	114,04	(37,17-198,04) - 4
112	1050,47	(1045,05-1055,89) - 2	43,21	(38,02-48,73) - 4	35,81	(34,87-36,76) - 2	90,31	(75,82-100,39) - 4	101,97	(97,24-106,69) - 2	62,43	(36,76-92,83) - 4
113	191,74	(160,24-223,24) - 2	60,06	(55,66-65,74) - 4	52,19	(51,25-53,14) - 2	62,28	(36,76-84,64) - 4	107,32	(97,24-117,40) - 2	87,00	(53,14-122,44) - 4
114	285,61	(276,16-295,06) - 2	69,52	(43,06-94,72) - 4	94,09	(87,79-104,17) - 4	76,29	(37,39-108,58) - 4	97,56	(88,42-106,69) - 2	89,52	(58,18-124,96) - 4
115	312,07	(286,60-355,54) - 2	86,84	(68,89-100,39) - 4	87,00	(57,55-116,14) - 4	69,52	(53,14-91,57) - 4	99,45	(89,68-109,21) - 2	88,57	(60,00-110,47) - 4
116	322,15	(305,14-339,16) - 2	75,19	(74,56-75,82) - 2	78,49	(70,15-88,42) - 4	141,34	(232,69-72,04) - 4	67,63	(67,00-68,26) - 2	54,55	(33,61-74,56) - 4
117	281,20	(2436,40-319,00) - 2	85,11	(79,60-94,09) - 2	65,11	(63,85-66,37) - 2	211,11	(143,23-281,83) - 4	69,84	(65,74-73,93) - 2	92,66	(46,21-140,70) - 4
118	179,14	(177,88-180,40) - 2	96,76	(71,41-116,77) - 4	67,15	(53,77-80,86) - 4	72,51	(56,29-87,79) - 4	48,09		48,09	(28,57-64,48) - 4
119	204,66	(203,71-205,60) - 2	153,94	(53,14-261,67) - 4	68,83	(40,32-97,87) - 4	82,28	(33,61-148,90) - 4	61,95		61,95	(30,46-95,35) - 4
120							109,84	(99,76-119,92) - 2	119,92	(110,47-129,37) - 2		
121	341,37	(324,67-358,00) - 2	90,78	(86,53-94,09) - 4	85,90	(84,64-87,16) - 2	127,32	(86,64-185,44) - 4	100,08	(99,13-101,02) - 2	53,45	(29,83-78,34) - 4
122	378,22	(353,02-403,42) - 2	68,25	(64,48-72,04) - 4	63,22	(62,59-63,85) - 2	159,46	(59,44-268,60) - 4			61,64	(50,62-73,30) - 4
123	929,38	(899,26-959,50) - 2	82,90	(77,08-88,42) - 4	88,42	(87,79-89,05) - 2	137,09	(82,12-214,42) - 4	192,37	(189,22-195,52) - 2	61,11	(38,65-84,64) - 4
124	167,49	(135,67-199,30) - 2	50,15	(41,17-58,81) - 4	83,69	(48,10-119,92) - 4	59,60	(47,47-65,11) - 4	84,64	(84,01-85,27) - 2	55,81	(43,06-70,78) - 4
125	381,21	(208,12-553,99) - 4	62,74	(44,95-78,97) - 4	58,02	(39,91-76,45) - 4	87,63	(79,60-93,46) - 4			54,08	(46,21-63,22) - 4
126	464,59	(211,90-726,20) - 4	76,34	(53,77-100,61) - 4	94,24	(54,40-134,41) - 4	90,15	(71,41-108,58) - 4			54,33	(34,24-76,21) - 4
127	492,87	(190,48-801,66) - 4	63,37	(52,51-69,52) - 4	97,87	(61,96-136,93) - 4	55,51	(37,39-67,00) - 4			48,25	(41,17-56,29) - 4
128	289,08	(191,11-383,89) - 4	85,26	(38,02-133,78) - 4	42,58	(32,98-51,25) - 4	144,28	(55,66-231,45) - 4			60,70	(48,72-74,56) - 4
129	145,43	(103,54-199,30) - 4	95,98	(87,79-102,91) - 4	79,12	(71,41-85,90) - 4	35,19	(34,24-36,13) - 2			41,32	(29,20-49,36) - 4
130	257,89	(175,36-359,95) - 4	78,97	(85,27-72,67) - 2	539,50	(94,72-986,80) - 4	74,25	(67,00-81,49) - 2			66,68	(46,84-90,31) - 4
131							62,59	(61,96-63,22) - 2				
132	255,84	(182,92-344,20) - 4	72,35	(63,85-78,34) - 4	79,44	(75,82-83,38) - 4	74,56	(72,67-76,45) - 2			60,38	(56,92-63,85) - 2
133	321,68	(252,22-381,37) - 4	67,31	(61,96-73,93) - 4	94,09	(85,90-101,02) - 4	104,17	(87,16-121,18) - 2			65,58	(46,21-84,64) - 4
134	493,83	(472,09-515,56) - 2	45,26	(44,32-46,21) - 2	51,24	(48,72-53,77) - 2	93,35	(85,90-104,80) - 2			30,46	(26,68-34,24) - 2
135	277,58	(98,50-472,09) - 4	79,60	(31,09-128,74) - 4	87,47	(79,60-95,35) - 4	307,98	(189,85-426,10) - 2			33,76	(22,27-45,58) - 4
136	277,26	(164,02-383,89) - 4	52,51	(47,47-60,07) - 4	676,68	(197,41-1153,12) - 4	114,25	(113,62-114,88) - 2			28,21	(26,05-31,09) - 4
137	170,48	(84,01-256,63) - 4	58,65	(56,92-62,59) - 4	142,75	(58,81-225,13) - 4	119,61	(102,28-136,93) - 2			43,53	(35,50-51,88) - 4
138	218,67	(199,30-286,24) - 4	62,91	(55,03-70,78) - 4	63,53	(53,77-75,19) - 4	66,10	(61,33-70,78) - 2			50,30	(48,73-51,88) - 2
139							84,96	(66,37-103,54) - 2				
140	341,37	(337,90-344,83) - 2	61,65	(60,07-63,22) - 2	99,76	(99,76-99,76) - 2	60,07	(54,40-65,74) - 2			49,04	(46,84-51,25) - 2
141	183,87	(117,40-242,14) - 4	78,97	(71,41-84,64) - 4	164,80	(97,24-232,69) - 4	76,45	(75,19-77,71) - 2			40,54	(37,39-43,69) - 2
142	149,53	(104,80-194,26) - 4	117,71	(104,80-128,74) - 4	103,06	(72,04-134,41) - 4	101,65	(95,35-107,95) - 2			61,96	(57,55-66,37) - 2
143	633,92	(467,68-799,25) - 4	53,45	(36,76-72,04) - 4	68,36	(43,06-94,09) - 4	310,18	(281,83-338,53) - 2			52,35	(34,24-80,23) - 4
144	1193,85	(1187,22-1200,48) - 2					206,86	(189,85-223,87) - 2				
145	160,87	(160,87-160,87) - 2	82,43	(80,86-84,01) - 2	73,30	(72,67-73,93) - 2	182,92	(166,54-199,30) - 2			51,45	(50,40-52,51) - 4
146	133,15	(111,10-155,20) - 2	77,40	(76,45-78,34) - 2	119,60	(118,03-121,18) - 2	143,86	(136,30-151,42) - 2			38,02	(37,39-38,65) - 2
147												
148	704,07	(681,18-726,96) - 2	86,53	(80,86-92,20) - 2							71,72	(67,63-75,82) - 2
149	314,28	(290,65-337,90) - 2	63,22	(59,44-67,00) - 2			240,25	(240,25-240,25) - 2			44,00	(42,43-45,58) - 2
150	498,82	(490,89-506,74) - 2	89,37	(87,16-91,57) - 2			259,47	(224,50-294,43) - 2			90,94	(90,31-91,57) - 2
151	888,42	(832,99-943,84) - 2	47,47	(43,69-51,25) - 2	96,29	(95,35-97,24) - 2	107,64	(95,98-119,29) - 2			37,70	(36,13-39,28) - 2
152	142,60	(130,00-155,20) - 2	47,47	(46,84-48,10) - 2	153,94	(153,31-154,57) - 2	75,19	(65,11-85,27) - 2			45,26	(43,06-47,47) - 2
153	126,54	(120,55-132,52) - 2	48,73	(46,21-51,25) - 2	107,32	(106,06-108,58) - 2	68,58	(55,66-81,49) - 2			35,81	(32,98-38,65) - 2

Para a cevada ter um bom grau de germinação e atender os requisitos de qualidade para a malteação, é necessário evitar geadas em estágio avançado da planta, bem como a ocorrência de chuvas no momento da colheita, evitando-se assim, por exemplo, efeitos como a germinação precoce que leva a perda de qualidade do grão.

Desde 2003, problemas climáticos no período de maturação do grão, vêm comprometendo a qualidade do produto final, sendo que a safra do ano de 2005 foi considerada uma das piores safras de cevada da história, principalmente pelo excesso de chuvas em setembro e outubro (Noemir Antoniazzi, Cooperativa Agrária Mista Entre Rios Ltda. Guarapuava, PR; comunicação pessoal).

Os efeitos climáticos podem ter afetado o desempenho das linhas DHs, em PF, nos dois últimos anos comparados no presente estudo (2003 e 2005), pois algumas linhas não demonstraram o mesmo desempenho de produção de atividade enzimática que tiveram no ano de 2002, onde o conjunto de fatores ambientais parece ter permitido a produção de alta atividade enzimática (interação genótipo-ambiente). Podemos verificar isto comparando os dados, por exemplo, da linha DH 112 (tabela 4), que em PF, no ano de 2002, apresentou uma atividade média de 1050,47 U/g, em 2003, 43,21 U/g e em 2005, 35,81 U/g. Já os locais de VG e GUA, neste estudo, e com este conjunto de linhas DHs, pareceram não ser favoráveis para uma alta produção de atividade das β -glucanases.

Na China, a importação de malte também é elevada, uma vez que a cevada produzida naquele país é considerada de qualidade inferior para a produção de malte, devido a um alto conteúdo de β -glucanos. Zhang et al. (2001, 2002) fizeram um estudo comparativo com relação ao conteúdo de β -glucanos em 164 variedades chinesas de cevada, colhidas no ano de 1999, em diferentes locais da China, e 21 cultivares comerciais do Canadá e Austrália. Os autores verificaram que muitas variedades chinesas não apresentavam os valores de conteúdo de β -glucanos tão superiores aos das cultivares Canadenses e Australianas e que este então não seria o fator limitante à qualidade de malteação, mas sim a atividade das (1-3, 1-4)- β -glucanases que seria muita baixa para os grãos produzidos em algumas áreas da China.

Como outras características da qualidade do malte, as (1-3, 1-4)- β -glucanases presentes na cevada malteada dependem tanto dos efeitos genotípicos como dos ambientais. Os dados da presente análise mostram que as (1-3, 1-4)- β -glucanases sofrem forte influência ambiental, confirmando o conhecimento prévio (STUART et al., 1986), pois a análise de variância mostrou diferenças significantes para a atividade das β -glucanases no malte seco entre os locais e anos estudados, bem como a interação entre os genótipos e os locais e anos analisados.

Stuart et al. (1986), encontraram que a atividade das β -glucanases foi influenciada mais fortemente pelo ambiente do que pelas condições genotípicas e cita outros autores que sugerem que a influência ambiental é mais importante, e que isto resultaria em uma baixa herdabilidade para a atividade destas enzimas quando comparadas a outras características relacionadas ao malte.

Georg-Kraemer et al. (2004), estudando as (1-3, 1-4)- β -glucanases no malte seco, analisaram quatro variedades brasileiras de cevada (Embrapa 127, CEV 96025, MN 698 e CEV 97047) em Passo Fundo, Víctor Graeff e Guarapuava e as médias locais foram significativamente maiores em Guarapuava, confirmando os resultados prévios da influência ambiental sobre esta característica. Esta influência, também foi verificada pelos referidos autores quando seus resultados obtidos no ano de 1999 em Encruzilhada do Sul, para mais outras 14 variedades de cevada, foram comparados com outros dados previamente publicados. Um exemplo disto é a cultivar Morex, uma cultivar norte-americana de qualidade para malteação. Zwickert-Menteur et al. (1996) observaram uma atividade enzimática média de 480,80 U/Kg no malte seco para esta cultivar em 3 locais da França (Toulouse, 1992; Clermont-Ferrand, 1993 e 1994; Dijon, 1994), enquanto que nas condições de Encruzilhada do Sul, Morex exibiu uma atividade média de somente 266,71 U/Kg.

Como a população estudada no presente trabalho era de indivíduos DHs, a variância genotípica presente é apenas aditiva. Assim a variância aditiva foi calculada e, posteriormente, obtida a herdabilidade no sentido restrito. A herdabilidade da atividade das (1-3, 1-4)- β -glucanases no malte seco para esta população estudada foi de $h^2 = 0,74$. Apesar, do valor obtido, representar uma

baixa herdabilidade para a característica analisada, um resultado negativo não seria esperado, pois a herdabilidade é avaliada entre valores que variam de 0 a 1. Este valor negativo pode ser um reflexo do tamanho da população DH estudada que pode ser considerado pequeno e dos dados de atividade obtidos nos diferentes anos. Georg-Kraemer (2004), analisando esta mesma população e com os dados de atividade enzimática obtidos para os três locais estudados em 2002 obteve uma herdabilidade de $h^2 = 0,23$.

Zwickert-Menteur et al. (1996) analisaram uma população DH de cevada de seis fileiras, proveniente da F_1 do cruzamento de Steptoe x Morex, quanto à atividade das (1-3, 1-4)- β -glucanases no malte seco e no malte verde e quanto à atividade das α -amilases. Estes autores encontraram alta herdabilidade no sentido restrito ($h^2 = 0,91$) para as (1-3, 1-4)- β -glucanases e forte correlação genética entre os quatro locais estudados para os três caracteres, indicando um grande efeito genotípico na variação do nível dessas enzimas. Esses dados, entretanto, discordam dos dados obtidos na literatura. As (1-3, 1-4)- β -glucanases sofrem forte influência ambiental, são enzimas que são sintetizadas “de novo” no início da germinação e dependem das condições de germinação dos grãos para serem sintetizadas e expressadas.

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram o conhecimento prévio de que características da qualidade do malte, no caso a atividade das (1-3, 1-4)- β -glucanases, são o produto de fatores genéticos e ambientais e também da interação genótipo-ambiente, e que em muitas situações os fatores ambientais são os componentes principais para a característica final observada. Esta situação deve ser levada em conta em programas de melhoramento. O programa de melhoramento da cevada desenvolvido na região Sul do Brasil tem considerado variações do clima e solo para recomendar as cultivares mais adaptadas às condições de cada região. Essa regionalização, apesar de depender de um grande número de informações sobre cultivares, pode gerar dados sobre as características agronômicas, rendimento e fatores de qualidade cervejeira das mesmas, proporcionando sucesso na prática desta cultura para os produtores e para indústria (MINELLA et al., 1996).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHOKAS, H.; NASKALI, L. Geographic variation of α -amilases, β -amilases, β -glucanase, pullunase and chitinase activity in germinating *Hordeum spontaneum* barley from Israel and Jordan. *Genetica*, v. 82, p. 73-78, 1990.

BRIGGS, D.E. Malt modification a century of evolving views. *J. Inst. Brew.*, v. 108, p. 395-405, 2002.

BRUNSWICK, P.; MANNERS, D.J.; STARRK, J.R. The development of β -D-glucanases during the germination of barley and the effect of kilning on individual isoenzymes. *J. Inst. Brew.*, v. 93, p. 181-186, 1987.

BUCKOW, R.; HEINZ, V.; KNORR, D. Effect of high hydrostatic pressure temperature combinations on the activity of β -glucanase from barley malt. *J. Inst. Brew.*, v. 111, p. 282-289, 2005.

EAGLES, H.A.; BEDGGOOD, A.G.; PANOZZO, J.F.; MARTIN, P.I. Cultivar and environmental effects on malting qualitat in barley. *Aust. J. Agric. Res.*, v. 46, p. 831-844, 1995.

FOX, G.P.; OSBORNE, B.; BOWMAN, J.; KELLY, A.; CAKIR, M; POULSEN, D.; INKERMAN, A.; HENRY, R. Measurement of genetic and environmental variation in barley (*Hordeum vulgare*) grain hardness. *J. Cer. Sci.*, v. 46, p. 82-92, 2007.

GEORG-KRAEMER, J.E. (1-3, 1-4)- β -glucanases na cevada (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* L.): atividade enzimática, obtenção de populações duplo-haplóides e regiões cromossômicas associadas. Porto Alegre: UFRGS, 2004. 166f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2004.

GEORG-KRAEMER, J.E.; CAIERÃO, E.; MINELLA, E.; BARBOSA-NETO, J.F.; CAVALLI, S.S. The (1-3, 1-4)- β -glutamates in malting barley: enzyme survival and genetic and environmental effects. *J. Inst. Brew.*, v. 110, p. 303-308, 2004.

HAYES, P.M.; LIU, B.H.; KNAPP, S.J.; CHEN, F.Q.; JONES, B.L.; BLAKE, T.K.; FRANCKOWIAK, J.D.; RASMUSSEN, D.; SORRELLS, M.; ULLRICH, S.E.; WESENBERG, D.M.; KLEINHOF, A. Quantitative trait locus effects and environmental interaction in a sample of North American barley germplasm. *Theor. Appl. Genet.*, v. 87, p. 392-401, 1993.

HENRY, R.J. Genetic and environmental variation in the pentosan and β -glucanases contents of barley, and their relation to malting quality. *J. Cer. Sci.*, v. 4, p.269-277, 1986.

KACZMAREK, Z.; ADAMSKI, T.; SURMA, M.; JEZOWSKI, S.; LESNIEWSKA-FRATCZAK, M. Genotype-environment interaction of barley doubled haploids with regard to malting quality. *Plant Breeding*, v. 118, p. 243-247, 1999.

LEHTONEN, M. e AIKASALO, R. β -Glucan in two and six-rowed barley. *Cereal Chemistry*, v. 64, p. 191-192, 1987.

LITTS, J.C.; SIMMONS, C.R.; KARRER, E.E.; HUANG, N.; RODRIGUEZ, R.L., The isolation and characterization of a barley (1-3, 1-4)- β -glucanase gene. *Eur. J. Biochem*, v. 194, p. 831-838, 1990.

MACGREGOR, A.W. Malting and brewing science: challenges and opportunities. *J. Inst. Brew.*, v. 102, p. 97-102, 1996.

MATHER, D.E.; TINKER, N.A.; LABERGE, D.E.; EDNEY, M.; JONES, B.L.; ROSSNAGEL, B.G.; LEGGE, W.G.; BRIGGS, K.G.; IRVINE, R.B.; FALK, D.E.; KASHA, K.J. Regions of the genome that affect grain and malt quality in a North American two-row barley cross. *Crop Science*, v. 37, p. 544-554, 1997.

McCLEARY, B.V.; SHAMEER, I. Assay of malte β -glucanase using azo-barley glucan: an improved precipitant. *J. Inst. Brew.*, v. 93, p. 87-90, 1987.

McELROY, D.; JACOBSEN, J. What's brewing in barley biotechnology? *Bio Technology*, v. 13, p. 45-249, 1995.

McFADDEN, G.I.; AHLUWALIE, B.; CLARKE, A.E.; FINCHER, G.B. Expression sites developmental regulation of genes encoding (1-3, 1-4)- β -glucanases in germinated barley. *Planta*, v. 173, p. 500-508, 1988.

MINELLA, E.; SILVA, M.S.; ÁRIAS, G. Potencial produtivo e características agrônômicas das cultivares de cevada cervejeira recomendadas para a região sul do Brasil. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1996. 28p. (EMBRAPA-CNPT. Circular Técnico, 8).

MINELLA, E. Clima bom para a cevada. *Zero Hora*, Porto Alegre, 14 de setembro de 2007.

MOLINA-CANO, J.L.; FRANCESCH, M.; PEREZ-VENDRELL, A.M.; RAMO, T.; VOLTAS, J.; BRUFAU, J. Genetic and environmental variation in malting and feed quality of barley. *J. Cer. Sci.*, v. 25, p. 37-47, 1997.

MOLINA-CANO, J.L.; SOPENA, A.; POLO, J.P.; BERGARECHE, C.; MORALEJO, M.A.; SWANSTON, J.S.; GLIDEWELL, S.M. Relationships between barley hordeins and malting quality in a mutant of cv. Triumph. II Genetic and Environmental effects on water uptake. *J. Cer. Sci.*, v. 36, p. 39-50, 2002.

NARASIMHALU, P.; KONG, D.; CHOO, T.D.; FERGUSON, T.; THERRIEN, M.C.; HO, K.M.; MAY, K.W.; JUI, P. Effects of environment and cultivar on total mixed-linkage glucan content in eastern and western Canadian barleys (*Hordeum vulgare* L.) *Canadian Journal of Plant Science*, v. 75, p. 371-376, 1995.

PEREZ-VEDRELL, A.M.; BRUFAU, J.; MOLINA-CANO, J.L.; FRANCESCH, M.; GUASCH, J. Effects of cultivar and environment on (1-3), (1-4)-D- β -glucan content and acid extract viscosity of Spanish barleys. *J. Cer. Sci.*, v. 23, p. 285-292, 1996.

SÁ, R.M.; PALMER, G.H. Re-Assessment of the half-grain modification method for assessing malt modification. *J. Inst. Brew.*, v. 111, p. 176-180, 2005.

SAS Institute. The SAS system for Windows, release 8.00. *SAS Institute*, Cary, N.C.

SATO, M.; WATARI, J.; TAKASHIO, M. Effect of growth media and strains on structural stability in small chromosome. *J. Inst. Brew.*, v. 108, p. 355-361, 2001.

SHEN-MILLER, J.; KREIS, M.; SHEWRY, P.R.; SPRINGALL, D.R. Spatial distribution of β -amylase in germinating barley seed based on the avidin - biotin - peroxidase complex method. *Protoplasma*, v. 113, p. 162-173, 1991.

SPEERS, A.R.; JIN, Y.L.; PAULSON, A.T.; STEWART, R.T. Effects of β -glucan shearing and environmental factors on the turbidity of wort and beer. *J. Inst. Brew.*, v. 109, p. 236-244, 2003.

STAUB, J.E.; SERQUEN, F.C.; GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Hort Science* 31:729–742, 1996.

STUART, M.; LOI, L.; FINCHER, G. B. Development of (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)- β -D-glucan endohydrolase isozymes in isolated scutella and aleurone layers of barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Physiol.*, v. 80, p. 310 – 314, 1986.

WOODWARD, J.R e FINCHER, G.B. Purification and chemical properties of two (1-3, 1-4)- β -glucan endohydrolases from germinating barley. *Eur. J. Biochem.*, v.121, p. 663-669, 1982.

WU Y.; SCHWARZ, P.B.; DOEHLERT, D.C.; DAHLEEN, L.S.; HORSLEY, R.D. Rapid separation and genotypic variability of barley (*Hordeum vulgare* L.) lipooxygenase isoenzymes. *J. Cer. Sci.*, v.25, p. 49-56, 1997.

ZHANG, G.; CHEN, J.; WANG, J.; DING, J. Cultivar and environmental effects (1-3, 1-4)- β -D-glucan and protein content in malting barley. *J. Cer. Sci.*, v. 34, p. 295-301, 2001.

ZHANG, G.; CHEN, J.; WANG, J. Analysis of β -glucan content in barley cultivars from different locations of China. *Food Chemistry.*, v. 79, p. 251-254, 2002.

ZWICKERT-MENTEUR S.; JESTIN, L.; BRANLAND, G. *Amy2* polymorphism as a possible marker of β -glucanases activity in barley. *J. Cer. Sci.*, v. 24, p. 55-63, 1996.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)