



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

**Lucas Dal Magro**

**INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DE DIFERENTES PREPARADOS**  
**ENZIMÁTICOS NA EXTRAÇÃO, QUALIDADE E COMPOSTOS BIOATIVOS DO**  
**SUCO DE UVA DA VARIEDADE “CONCORD”**

**Porto Alegre**

**2016**

**Lucas Dal Magro**

**INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DE DIFERENTES PREPARADOS  
ENZIMÁTICOS NA EXTRAÇÃO, QUALIDADE E COMPOSTOS BIOATIVOS DO  
SUCO DE UVA DA VARIEDADE “CONCORD”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**Orientador: Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Manuela Poletto Klein**

**Porto Alegre**

**2016**

CIP - Catalogação na Publicação

Dal Magro, Lucas

INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DE DIFERENTES PREPARADOS  
ENZIMÁTICOS NA EXTRAÇÃO, QUALIDADE E COMPOSTOS  
BIOATIVOS DO SUCO DE UVA DA VARIEDADE "CONCORD" /  
Lucas Dal Magro. -- 2016.

169 f.

Orientador: Rafael Costa Rodrigues.

Coorientadora: Manuela Poletto Klein.

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

1. Tecnologia enzimática. 2. Pectinases e  
celulases. 3. Extração de suco de uva. 4. Compostos  
bioativos. 5. Combi-CLEAs. I. Rodrigues, Rafael  
Costa, orient. II. Klein, Manuela Poletto,  
coorient. III. Título.

Lucas Dal Magro

**DISSERTAÇÃO**

INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DE DIFERENTES PREPARADOS ENZIMÁTICOS  
NA EXTRAÇÃO, QUALIDADE E COMPOSTOS BIOATIVOS DO SUCO DE UVA DA  
VARIEDADE “CONCORD”

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau em

**MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

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

Pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues

Orientador – PPGCTA/UFRGS

Homologada em: ...../...../.....

Por:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Manuela Poletto Klein

Coorientadora-UFCSPA

Prof. Dr. Vitor Manfroi

Banca – UFRGS

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosane Rech

Coordenador do Programa de Pós Graduação  
em Ciência e Tecnologia de Alimentos  
(PPGCTA)

Prof. Dr. Júlio Xandro Heck

Banca – IFRS

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vilásia Guimarães Martins

Banca-FURG

Prof. Dr. Vitor Manfroi

Diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia  
de Alimentos - ICTA/UFRGS

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador Prof. Rafael Costa Rodrigues e a minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Manuela Poletto Klein, pela disponibilidade e dedicação na minha orientação, por todas ajudas e ensinamentos transmitidos ao longo destes 2 anos.

Aos Prof. Vitor Manfroi, Plinho Francisco Hertz e Eliseu Rodrigues por toda contribuição para o desenvolvimento do trabalho.

Aos bolsistas, Vitória Conter, Natália Paludo, Camila Tiefensee Ribeiro, Daniela Goetze, Joana Alves, Daiane Danelli, pelas suas colaborações durante a realização dos experimentos deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biocatálise e Tecnologia enzimática, Micheli Bueno, Diandra de Andrades e Luiza Dalagnol, pela amizade e ajuda no dia-a-dia.

A todos os colegas do Grupo de Biotecnologia, Bioprocessos e Biocatálise.

A Capes pelo suporte financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial aos seus professores e funcionários, pela prestreza em todos os momentos.

Aos amigos Roger, Karine, Luz, Paulo, Pedrucci, Cristhian, Joel, André e ao pessoal da Confraria Vinum Vita, pelos bons momentos que passamos neste período.

Aos meus pais, avós e familiares, que mesmo distantes, sempre estiveram no meu coração, me dando forças, carinho e todo apoio para a conclusão deste trabalho.

E em especial, a minha namorada Alessandra que sempre esteve ao meu lado, me apoiando nas horas difíceis e comemorando comigo minhas alegrias.

## RESUMO

Na produção de suco de uva, a adição de preparados enzimáticos durante a maceração, antes da prensagem, é um pré-requisito para a obtenção de rendimentos satisfatórios de suco, além de melhorar a qualidade organoléptica, promovendo uma maior extração de cor e compostos bioativos. Uma segunda aplicação enzimática pode ser realizada após o processo de prensagem no suco ainda turvo, buscando reduzir essa turbidez, o que facilitará os processos de clarificação e filtração posteriores, aumentando a produtividade dessas etapas. Porém, existe um grande número de enzimas comerciais disponíveis para a aplicação na indústria de sucos, sendo assim, é importante avaliar o potencial de cada preparado enzimático para uma utilização correta. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da composição dos diferentes preparados enzimáticos na extração, qualidade e compostos bioativos do suco de uva elaborado com a variedade Concord. Primeiramente, o efeito de oito diferentes preparados enzimáticos foi avaliado para extração e qualidade do suco de uva. Subsequentemente, os dois preparados enzimáticos que se destacaram (Pectinex® Ultra Clear e Lallzyme® Beta), foram utilizados de forma sinérgica em um planejamento experimental, buscando encontrar a condição ótima de tempo, temperatura, concentração de enzima e proporção de Pectinex® Ultra Clear/Lallzyme® Beta, que pudesse maximizar a extração do suco de uva. E, por fim, foram obtidos agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs), como forma de imobilização das diferentes enzimas encontradas nos preparados enzimáticos para a clarificação do suco de uva. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biocatálise e Tecnologia Enzimática do ICTA/UFRGS. As uvas utilizadas nos experimentos foram da variedade Concord fornecida pela empresa Vitivinícola Jolimont, de Canela, RS. As preparações enzimáticas utilizadas foram caracterizadas em relação a cinco atividades enzimáticas, sendo elas, pectinase total (PE), poligalacturonase (PG), pectina liase (PL), pectina metil esterase (PME) e celulase (CE). Desta mesma forma, os combi-CLEAs foram caracterizados em relação as suas atividades enzimáticas, além disso, sua estabilidade, reutilização e pH e temperatura ótima foram avaliados. Os compostos bioativos foram identificados e quantificados por HPLC-DAD-MS (cromatografia líquida de alta eficiência - detector de arranjo de diodos - espectro de massa) e a atividade antioxidante foi avaliada através dos métodos de ABTS e de capacidade redutora. Rendimentos superiores de suco foram obtidos com os preparados que apresentaram altas concentrações de PG e PME ou PL. Quando, o preparado Pectinex® Ultra Clear (PUC) foi utilizado, observou-se um aumento de 8,7% na quantidade de suco extraído em comparação com o controle. Já os maiores valores de compostos bioativos foram encontrados com os preparados que apresentaram em sua composição uma maior atividade CE (Lallzyme® Beta, LB). Entretanto, quando PUC e LB foram adicionados em conjunto, maiores valores de rendimento e compostos bioativos foram encontrados. Já os combi-CLEAs, se mostraram como uma ótima forma de enzima imobilizada para a clarificação do suco de uva. Dentre os combi-CLEAs produzidos, destacaram-se o combi-CLEA-BSA devido à melhor atividade enzimática e maior estabilidade térmica (3 vezes mais que a enzima solúvel), podendo ser reutilizados por 6 ciclos com conversão total do substrato em produto. Além disso, o combi-CLEA-BSA melhorou a clarificação do suco, obtendo uma redução da turbidez de 56.7 % em 1 h. Por fim, pode-se afirmar que o trabalho atingiu melhorias produtivas e qualitativas ao suco de uva através da tecnologia enzimática.

Palavras-chave: pectinases; celulases; suco de uva; compostos bioativos; combi-CLEAs.

## ABSTRACT

In grape juice production, the addition of enzyme preparations during the maceration prior to pressing is a prerequisite for obtaining satisfactory juice yield, besides it improves the organoleptic quality, improving color and bioactive compounds extraction. A second enzyme application may be performed after the pressing process in cloudy juice, in order to reduce this turbidity, facilitating clarification and filtration processes. However, there are a great number of commercial enzymes available to the application on the fruit juice industry, so it is important to know the ability of each enzyme preparation for correct use. Thus, the aim of this study was to evaluate the influence of the composition of the different enzymatic preparations in the extraction, quality and bioactive compounds of grape juice from Concord variety. Firstly, the effect of eight different enzyme preparations was evaluated for extraction and quality of grape juice. Subsequently, the best enzyme preparations (Pectinex® Ultra Clear and Lallzyme® Beta) were used in an experimental design to find the optimal time, temperature, enzyme concentration and ratio of Pectinex® Ultra Clear/Lallzyme® Beta which could maximize the extraction of grape juice. Finally, cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) were obtained as a way to immobilize the different enzymes found in the enzyme preparations for grape juice clarification. The experiments were performed at the Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Technology, ICTA/UFRGS. The grapes (Concord variety) were provided by Vitivinícola Jolimont, Canela, RS. The enzymatic preparations were characterized through of five enzymatic activities, being total pectinase (PE), polygalacturonase (PG), pectinlyase (PL), pectin methyl esterase (PME) and cellulase (CE). In the same way, the combi-CLEAs were characterized regarding their enzymatic activities, thermal, pH and operational stabilities, and optimal pH and temperature. The bioactive compounds were identified and quantified by HPLC-DAD-MS (High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector – Mass Spectrum) and the antioxidant activity was performed by the method of ABTS and reducing capacity. High juice yield was obtained with the preparations that presented higher concentrations of PG, PME or PL activities. The Pectinex® Ultra Clear, when compared with the control, provided an increase of 8.7 % in the amount of juice extracted. On the other hand, the highest values of bioactive compounds were found for preparations with higher CE activity (Lallzyme® Beta). However, when PUC and LB were added together, higher values for yield and bioactive compounds were found. Already, regarding the combi-CLEAs, it appears to be a potential immobilized enzyme for clarification of grape juice. Among the combi-CLEAs obtained, combi-CLEAs-BSA presented the best enzyme activities, higher thermal stabilities (3 times more than the soluble enzyme) and it can be reused for 6 cycles with a total conversion of substrate to product. Furthermore, the combi-CLEA-BSA improved the juice clarification, obtaining 56.7 % in turbidity reduction in 1 h. Finally, it can be concluded that the work reached productive and qualitative improvements for grape juice through enzymatic technology.

Keywords: pectinases; cellulases; grape juice; bioactive compounds; combi-CLEAs.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura 1. Comercialização de suco de uva elaborado no RS em 2004-2015. ....	19
Figura 2. Exemplos de ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b).....	22
Figura 3. Estrutura base das maiores classes dos flavonóides.....	24
Figura 4. Disposição dos principais componentes da parede celular vegetal ao longo da sua estrutura. ....	27
Figura 5. Estrutura da pectina.....	28
Figura 6. Estrutura molecular da celulose. ....	29
Figura 7. Representação das ligações moleculares da cadeia de celulose.....	30
Figura 8. Ação enzimática das pectinases em uma molécula de pectina. PMGL: pectina liase. PMG: polimetilgalacturonase; PMGE: pectina metil esterase; PGL: pectato liase; PG: poligalacturonase. ....	34
Figura 9. Ação das enzimas celulasas sobre a molécula de celulose. ....	36
Figura 10. Mecanismo de formação do complexo pectina-proteína. ....	38
Figura 11. Métodos de imobilização de enzimas. ....	41
Figura 12. Produção de CLEAs com enzimas deficientes em grupamentos amino (a) e com adição de BSA (b). ....	44

### Capítulo 2

Figura 1. Gradiente linear das soluções de fase móvel.....	61
--	----

### Capítulo 3

Figure 1. Juice yield after treatment with Pectinex® Ultra Clear using different enzyme concentrations.....	76
---	----



Figure 2. Juice extraction yields using eight different commercial enzyme preparations. Means followed by the same letters do not differ by Tukey's test at 5% probability. ....	78
Figure 3. HPLC chromatograms of phenolics compounds in grape juice. Peak identification: <b>1.</b> 2-S-glutathionylcaftaric acid, <b>2.</b> Cyanidin-3,5-O-diglucoside, <b>3.</b> Caffeic acid-O-hexoside, <b>4.</b> Malvidin-3,5-O-diglucoside, <b>5.</b> Caftaric acid, <b>6.</b> Cyanidin-3-O-glucoside, <b>7.</b> <i>p</i> -coumaric acid glucoside, <b>8.</b> Peonidin-3-O-glucoside, <b>9.</b> Malvidin-3-O-glucoside, <b>10.</b> Fertaric acid, <b>11.</b> Cyanidin-3-O-6-O-(acetyl)glucoside, <b>12.</b> Cyanidin-3-(6-O- <i>p</i> -coumaryl),5-O-diglucoside, <b>13.</b> Peonidin-3-(6-O- <i>p</i> -coumaryl),5-O-diglucoside <b>14.</b> Quercetin-3-O-glucoside, <b>15.</b> Cyanidin-3-(6-O- <i>p</i> -coumaryl)glucoside. ....	85
Figure 4. Simplified scheme of the cell wall structure. ....	87

#### Capítulo 4

Figure 1. Contour plots for (a) juice yield and (b) reducing capacity for PUC/LB ratio versus temperature. In each figure, the missing variables were fixed at the optimal point (○) condition for maximal extraction for each separate response, (□) optimal condition for maximize both responses (51 °C and 0.52 PUC/LB ratio) .....	109
Figure 2. Prediction profiles for the variables tested in the CCD. JY: juice yield; RC: reducing capacity. Response desirability maximizing both responses at the same time.....	110
Figure 3. HPLC chromatograms of phenolics compounds in grape juice. Peak identification: <b>1.</b> Galloyl-O-glucoside, <b>2.</b> Gallic acid, <b>3.</b> Feruloyl di-hexoside, <b>4.</b> Feruloyl di-hexoside, <b>5.</b> 2-S-glutathionylcaftaric acid, <b>6.</b> Cyanidin-3,5-O-diglucoside, <b>7.</b> Malvidin-3,5-O-diglucoside, <b>8.</b> <i>p</i> -coumaric acid glucoside, <b>9.</b> Cyanidin-3-O-glucoside, <b>10.</b> Petunidin 3-O-glucoside, <b>11.</b> Feruloyl O-hexoside, <b>12.</b> Caftaric acid, <b>13.</b> Peonidin-3-O-glucoside, <b>14.</b> Malvidin-3-O-glucoside, <b>15.</b> Fertaric acid, <b>16.</b> Delfinidin 3-O-6-O-(acetyl)glucoside Cyanidin-3-O-6-O-(acetyl)glucoside, <b>17.</b> Delfinidin-3-(6-O- <i>p</i> -coumaryl),5-O-diglucoside, <b>18.</b> Cyanidin-3-(6-O- <i>p</i> -coumaryl),5-O-diglucoside, <b>19.</b> Peonidin-3-(6-O- <i>p</i> -coumaryl),5-O-diglucoside, <b>20.</b>	

Quercetin-3-O-glucoside, 21. Delphinidin-3-O-(6-O-p-coumaryl)glucoside, 22. Cyanidin-3-(6-O-p-coumaryl)glucoside, 23. Malvidin-3-O-(6-O-p-coumaryl)glucoside. .... 115

## Capítulo 5

- Figure 1. Turbidity of the grape juice after treatment with eight different commercial enzymatic preparations. The measurements were performed in triplicate and the error bar represents the percentage error. .... 133
- Figure 2. Effect of acetone, ethanol, tert-butanol and isopropyl alcohol as precipitant agents. The measurements were performed in triplicate and the error bar represents the percentage error. .... 134
- Figure 3. Contour plots for the recovered activity varying glutaraldehyde concentration (mM) and reaction time (h). .... 135
- Figure 4. Effect of the enzyme concentration in combi-CLEAs activity (bars) and recovered activity (points) under the conditions of 110 mM of glutaraldehyde and 2 h of reaction. .... 137
- Figure 5. Effect of the BSA concentration in combi-CLEAs activity and recovered activity under the conditions of 110 mM of glutaraldehyde, 2 h of reaction and  $0.4 \text{ mg.mL}^{-1}$  of enzyme concentration. .... 138
- Figure 6. Thermal inactivation kinetics of soluble enzyme (■), combi-CLEAs (○) and combi-CLEAs-BSA (△) at 50 °C. .... 141
- Figure 7. Contour plots of recovered activity for optimal pH and temperature for: a) soluble enzyme; b) combi-CLEAs; and c) combi-CLEAs-BSA. .... 143
- Figure 8. Reusability of combi-CLEAs (■) and combi-CLEAs-BSA (○) for pectin hydrolysis. .... 144
- Figure 9. Grape juice clarification with soluble enzyme, combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA. .... 145

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1. Funções e aplicações de enzimas na indústria de alimentos e de vinhos. .... 39

### Capítulo 2

Tabela 1. Principais enzimas, atividades e microrganismo declarado pelos fabricantes. .... 46

Tabela 2. Planejamento experimental para otimização da extração do suco de uva. .... 48

Tabela 3. Planejamento experimental para otimização do preparo dos combi-CLEAs. .... 50

Tabela 4. Planejamento experimental para determinação do pH e temperatura ótimos de atividade para a enzima solúvel, combi-CLEAs e combi-CLEAs-BSA. .... 51

Tabela 5. Validação das curvas analíticas pelo HPLC-DAD. .... 62

### Capítulo 3

Table 1. Total pectinase activity (PE), polygalacturonase (PG), pectinlyase (PL), pectin methylesterase (PME) and cellulase (CE) in commercial enzyme preparations. .... 75

Table 2. Concentrations of enzyme activity applied for grape juice extractions. .... 77

Table 3. Analysis of pH, total acidity, °Brix and reducing sugars of the juices prepared with eight different commercial enzyme preparations. .... 79

Table 4. Analysis of color of the juices treated with eight different commercial enzyme preparations. .... 80

Table 5. Chromatographic, UV-Vis, and Mass Spectroscopy Characteristics of phenolic compounds in grape juice, obtained by HPLC-DAD-MS. .... 82

Table 6. Phenolic compounds concentration in the grape juice extracted by eight different commercial enzyme preparations. .... 83

Table 7. Analysis of antioxidant capacity of the juices treated with eight different commercial enzyme preparations. .... 88

## Capítulo 4

Table 1. Process variables and their coded and real levels used in CCD.....	101
Table 2. Experimental design and results of CCD. ....	102
Table 3. Total pectinase activity (PE), polygalacturonase (PG), pectinlyase (PL), pectin methylesterase (PME) and cellulase (CE) in commercial enzyme preparations.....	105
Table 4. Statistical analysis of the CCD. ....	107
Table 5. Analysis of yield, pH, Total acidity, °Brix, Reducing sugars and color of the juices prepared with different enzymatic treatments. ....	112
Table 6. Chromatographic, UV–Vis, and Mass Spectroscopy Characteristics of phenolic compounds in grape juice, obtained by HPLC–DAD–MS. ....	116
Table 7. Phenolic compounds concentration in the grape juice extracted by different enzymatic treatments. ....	118
Table 8. Analysis of antioxidant capacity of the juices treated with different enzymatic treatments. ....	119

## Capítulo 5

Table 1. Experimental design and results of optimization for combi-CLEAs preparation. ...	136
Table 2. Enzymatic activities of the soluble enzyme, combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA .....	139
Table 3. Experimental design and results of optimal pH and temperature for soluble enzyme, combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA.....	142

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	16
CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
1.1. SUCO DE UVA.....	19
1.1.1. Compostos fenólicos da uva .....	20
1.1.2. Composição do suco de uva.....	25
1.2. ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR DOS VEGETAIS .....	26
1.2.1. Substâncias pécticas.....	27
1.2.2 Celulose.....	29
1.3. ENZIMAS PECTINOLÍTICAS .....	31
1.3.1. Hidrolases .....	32
1.3.2. Liases .....	32
1.3.3. Esterases.....	33
1.3.4. Protopectinases .....	33
1.4. ENZIMAS CELULOLÍTICAS .....	34
1.5. APLICAÇÃO DE ENZIMAS EM SUCOS .....	36
1.6. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....	40
1.6.1. Agregados enzimáticos entrecruzados .....	41
CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
2.1. MATERIAIS.....	45
2.1.1. Uvas .....	45
2.1.2. Enzimas.....	45
2.1.3. Reagentes .....	46
2.2. EXTRAÇÃO DO SUCO DE UVA .....	46

2.2.1. Planejamento experimental para a extração do suco de uva.....	47
2.2. PREPARAÇÃO DOS COMBI-CLEAS.....	48
2.2.1. Seleção do agente precipitante.....	49
2.2.2. Planejamento experimental para a preparação dos combi-CLEAs.....	50
2.2.3. Determinação do pH e da temperatura ótima.....	50
2.2.4. Avaliação da estabilidade térmica e estabilidade ao pH.....	51
2.2.5. Estabilidade operacional.....	52
2.3. CLARIFICAÇÃO DO SUCO DE UVA.....	52
2.4. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	53
2.4.1. Determinação da atividade de pectinase total (PE).....	53
2.4.2. Determinação da atividade de poligalacturonase (PG).....	54
2.4.3. Determinação da atividade de pectina liase (PL).....	55
2.4.4. Determinação da atividade de pectina metil esterase (PME).....	56
2.4.5. Determinação da atividade de celulase total (CE).....	57
2.4.6. Determinação de sólidos solúveis totais (°Brix).....	57
2.4.7. Determinação de açúcares redutores.....	58
2.4.8. Determinação da acidez total.....	58
2.4.9. Determinação do pH.....	59
2.4.10. Determinação da cor.....	59
2.4.11. Determinação de compostos fenólicos por HPLC-DAD-MS.....	59
2.4.12. Determinação da capacidade redutora.....	62
2.4.13. Determinação da capacidade antioxidante pelo método do ABTS.....	62
2.4.14. Quantificação de proteínas.....	63
2.4.15. Determinação da turbidez.....	64

CAPÍTULO 3 - Identification of bioactive compounds from <i>Vitis labrusca</i> L. variety Concord grape juice treated with commercial enzymes: improved yield and quality parameters.....	65
CAPÍTULO 4 - Synergistic effects of Pectinex® Ultra Clear and Lallzyme® Beta on yield and bioactive compounds extraction of Concord grape juice.....	94
CAPITULO 5 - Preparation and characterization of combi-CLEAs from pectinases and cellulases: a potential biocatalyst for grape juice clarification.....	123
CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO GERAL.....	150
CONCLUSÃO.....	155
PERSPECTIVAS FUTURAS .....	156
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	157
APÊNDICE A – Fluxograma da produção de suco de uva.....	166
APÊNDICE B – Curvas analíticas para determinação das atividades enzimáticas, açúcares, capacidade antioxidante e proteínas.....	167
APÊNDICE C – Curvas analíticas para quantificação dos compostos fenólicos por HPLC-DAD.....	168
APÊNDICE D – Determinação das atividades enzimáticas na condição de plena atividade das enzimas.....	169

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a demanda por produtos mais saudáveis e benéficos à saúde por parte dos consumidores vem aumentando, principalmente, pela difusão de informações sobre os benefícios que esses alimentos proporcionam à saúde. Diversos estudos apontam os benefícios que a uva e seus derivados podem proporcionar à saúde humana.

Dentre esses derivados da uva, pode-se destacar o suco, que é uma bebida que pode ser facilmente incluída na dieta humana, desde crianças até idosos, casos em que o vinho não é indicado pela presença de álcool. Os sucos de uva são ricos em compostos bioativos capazes de diminuir o dano causado pelo estresse oxidativo, auxiliando na prevenção de muitas doenças, como câncer, doenças cardiovasculares e neurológicas (Dani et al., 2009), sendo os compostos fenólicos, tais como flavonóides, antocianinas, taninos, ácidos fenólicos, entre outros, os principais responsáveis por estes efeitos benéficos.

O crescimento da produção de uvas e seus derivados faz deste setor um dos mais importantes da agroindústria brasileira. No Rio Grande do Sul, esta importância é ainda maior, pois o Estado permanece sendo o principal produtor de uva no país. Anualmente são produzidas 1,4 milhões de toneladas de uva no Brasil, sendo que cerca de 45 % deste total é destinado a elaboração de vinhos, sucos e derivados e o restante é comercializado *in natura*. Destes 45 % de uvas destinadas à industrialização, 25 % são utilizadas para a produção de suco, entretanto, observa-se um crescimento constante desta porcentagem nos últimos anos. Segundo dados da União Brasileira de Vitivinicultura (UVIBRA, 2015), de janeiro a novembro de 2015, foram comercializados 136.087.204 litros de suco de uva, um aumento de 20,69 % em relação a 2014 e um aumento de 136,74 % em relação a 2010, evidenciando um grande crescimento em 5 anos.



Com o crescimento do consumo do suco de uva, novas marcas estão surgindo, deixando o mercado mais competitivo, o que leva o consumidor a exigir cada vez mais características de qualidade. Além da sua composição benéfica à saúde, os aspectos sensoriais são muito importantes para a aceitação do produto. Sucos com aroma e sabor pronunciados, boa aparência e coloração, são características fundamentais de qualidade. Porém, algumas características do suco de uva, como a sua rica composição em substâncias pécnicas, podem influenciar o rendimento produtivo, bem como, sua qualidade, podendo este fator estar diretamente ligado com a aceitação do produto. Por isso, práticas como a aplicação de enzimas vêm sendo utilizadas buscando melhorar essas características.

Preparados comerciais de pectinases e celulases podem desempenhar um papel fundamental no aumento da produtividade, na extração de cor e compostos bioativos dos tecidos vegetais, na melhoria da turbidez e na redução da viscosidade dos sucos, melhorando a eficiência dos processos de clarificação e filtração, contribuindo assim, para a melhoria das características de qualidade exigidas pelo mercado consumidor.

A utilização de pectinases e celulases imobilizadas também podem ser uma opção para melhorar as características sensoriais do suco de uva, permitindo que essas enzimas insolúveis sejam reutilizadas, possibilitando o seu uso contínuo, melhorando o controle e a estabilidade do processo. Entre as diversas metodologias de imobilização de enzimas, os agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) destacam-se pelo seu simples, rápido e econômico processo de preparo, permitindo a imobilização de moléculas heterogêneas de enzimas no mesmo agregado, característica interessante para a aplicação nos sucos, visto que são várias enzimas atuando em sinergia na hidrólise dos polissacarídeos. O uso de enzimas imobilizadas já vem sendo aplicada com êxito para a clarificação de sucos, porém não há relatos da utilização de CLEAs.

Este trabalho tem como objetivo principal avaliar a influência da composição dos diferentes preparados enzimáticos na extração, qualidade e compostos bioativos do suco de uva elaborado com a variedade de uva Concord.

Os objetivos específicos são:

- Caracterizar os diferentes preparados enzimáticos comerciais para produção de sucos;
- Avaliar a influência das diferentes enzimas na produtividade e qualidade do suco de uva;
- Estudar a combinação de enzimas e as condições ideais para maximizar o efeito da sua aplicação no suco de uva;
- Estudar o preparo de combi-CLEAs para obter derivados estáveis e ativos para a clarificação do suco de uva;
- Avaliar a estabilidade e reuso dos combi-CLEAs.

A presente dissertação de mestrado foi desenvolvida principalmente no Laboratório de Biocatálise e Tecnologia Enzimática do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

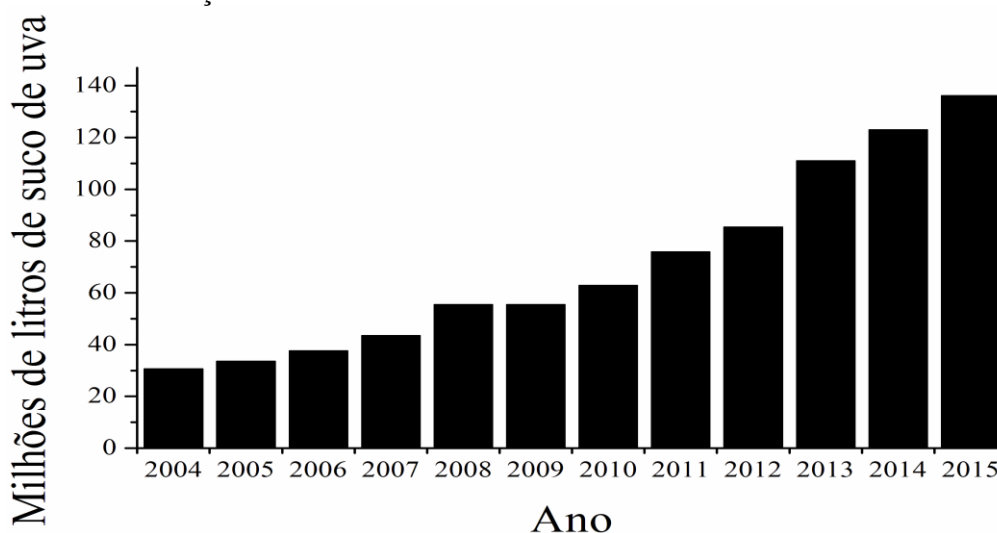
Este trabalho encontra-se organizado da seguinte forma: no Capítulo 1 está apresentada a revisão bibliográfica abordando os principais pontos do tema proposto. O Capítulo 2 apresenta a descrição dos materiais e métodos utilizados nos experimentos. Os Capítulos 3, 4 e 5 apresentam os resultados obtidos, na forma como foram submetidos à publicação em periódicos internacionais. Por fim, no Capítulo 6 é apresentada a discussão geral e, em seguida, as principais conclusões obtidas e as perspectivas para os trabalhos futuros.

## CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. SUCO DE UVA

Suco ou sumo é a bebida não fermentada, não concentrada, ressalvados os casos a seguir especificados, e não diluída, destinada ao consumo, obtida da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de origem, por processamento tecnológico adequado, submetida a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo (BRASIL, 2009). O suco de uva é uma bebida fresca e nutritiva, apreciada em todo o mundo, e com crescente aumento da sua produção a cada ano. O Brasil, juntamente com os Estados Unidos, é um dos principais produtores e consumidores de suco de uva, destacando o estado do Rio Grande do Sul por ser o principal produtor do país (UVIBRA, 2015). Inicialmente, a produção de suco de uva surgia como uma maneira de processar as uvas americanas, que até então, eram destinadas a elaboração de vinho comum, e que já não encontrava mais mercado. Nos primeiros sucos produzidos, já era observada notória qualidade, o que fez o suco ganhar rapidamente o mercado e aumentar a sua produção (Fig. 1).

Figura 1. Comercialização de suco de uva elaborado no RS em 2004-2015.



Fonte: UVIBRA (2015).

Esse cenário favorável é, em grande parte, devido ao conhecimento sobre os componentes bioativos do suco e seus benefícios relacionados à saúde humana. Vários estudos clínicos sobre as uvas e seus derivados têm demonstrado essas propriedades, incluindo a proteção contra doenças cardiovasculares (Coimbra et al., 2005; Dohadwala e Vita, 2009), aterosclerose (Aviram e Fuhrman, 2002), hipertensão (Mudnic et al., 2010), câncer (Jang et al., 1997), diabetes (Zunino, 2009) e problemas neurológicos (Joseph et al., 2009). O mecanismo de ação tem sido atribuído à atividade antioxidante (Modun et al., 2008), regulação de lipídeos (Ursini e Sevanian, 2002; Dávalos et al., 2006) e efeitos anti-inflamatórios (Castilla et al., 2006; Percival, 2009).

Muitos desses benefícios estão ligados aos compostos antioxidantes encontrados no suco de uva, tais como flavonóides, antocianinas, taninos, ácidos fenólicos, entre outros (Abe et al. 2007; Capanoglu et al. 2013). Os constituintes fenólicos têm uma grande importância na enologia, devido ao papel que desempenham direta ou indiretamente sobre a qualidade dos produtos obtidos a partir da uva. Os compostos fenólicos agem como antioxidantes não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também por causa de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de ácidos graxos e de óleos (Cuvelier et al., 1992).

### **1.1.1. Compostos fenólicos da uva**

Os compostos fenólicos de maior ocorrência natural apresentam-se conjugados com mono e polissacarídeos, através de um ou mais dos grupos fenólicos, e podem também ocorrer como derivados funcionais, como ésteres e metil ésteres flavonoides (Cabrita et al., 2002). Do ponto de vista químico, os compostos fenólicos são caracterizados por apresentar um núcleo benzênico agrupado a um ou vários grupos hidroxila, tendo sua classificação baseada na distinção entre compostos flavonóides e não flavonoides (Cabrita et al., 2002). A

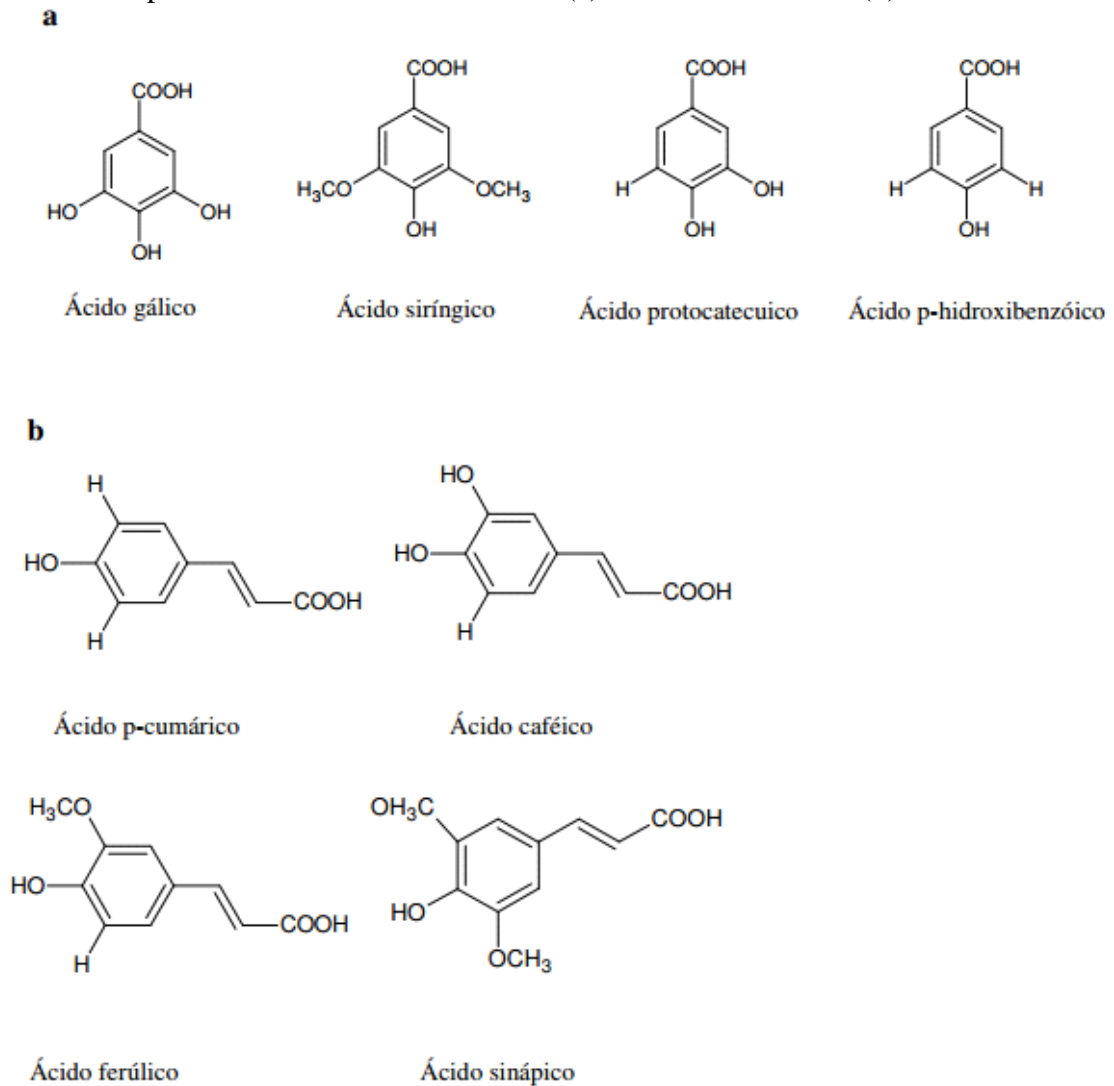
atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende da sua estrutura, particularmente do número e posição dos grupos hidroxila e da natureza das substituições nos anéis aromáticos (Balasundram et al. 2006).

Os compostos não flavonóides compreendem os ácidos fenólicos, hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, e outros derivados fenólicos como os estilbenos (Flanzy, 2000). Os ácidos fenólicos são compostos simples formados por um anel aromático e os substituintes ligados à sua estrutura (Fig. 2), conferindo capacidade de sequestrar espécies reativas, como o radical hidroxila e o oxigênio singleto (Marinova e Yanishlieva, 2003). Nas uvas, os ácidos fenólicos são, principalmente, os ácidos hidroxicinâmicos (ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e ácido cafeico) que se encontram nos vacúolos das células da película e polpa (Guerra, 2005). Os principais derivados de ácido hidroxibenzóico são os ácidos: salicílico, vanílico, hidroxibenzóico, gentísico, siríngico, gálico e protocatéquico. Entre os estilbenos, o resveratrol é o mais conhecido, o qual se encontra na casca da uva e sua concentração varia em função de fatores diversos, dentre os quais a variedade de uva (Guerra, 2005). Os ácidos fenólicos, além de se apresentarem sob sua forma livre, podem também estar ligados entre si ou com outros compostos (Bravo, 1998).

Os flavonóides são compostos fenólicos que se caracterizam por um esqueleto básico e comum C6-C3-C6. A estrutura base consiste em dois anéis aromáticos ligados por um anel pirano (Zoecklein et al., 1995). Esta grande família é dividida em inúmeras subclasses, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanóis e antocianinas (Fig. 3), as quais se distinguem entre si pelo grau de oxidação do anel pirano (Balasundram et al. 2006). Grande parte da estrutura e da cor dos vinhos e sucos deve-se a esta família de compostos. De todos eles, os flavonóis, os flavanóis e as antocianinas são quantitativamente os mais importantes. Os flavonóides podem encontrar-se no estado livre ou polimerizados com outros flavonóides, açúcares e compostos não flavonoides (Cabrita et al., 2002). Os flavonóides, particularmente

as antocianinas, são efetivos doadores de hidrogênio. Seu potencial antioxidante é dependente do número e da posição dos grupos de hidrogênio e suas conjugações, e também devido à presença de elétrons nos anéis benzênicos (Cao et al., 1997).

Figura 2. Exemplos de ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b).



Fonte: Balasundram et al., (2006).

Os flavonóis são caracterizados pela presença de uma insaturação no anel heterocíclico e um grupo hidroxilo na posição 3, sendo os mais importantes: quempferol, quercetina e miricetina. Nas uvas encontram-se apenas nas películas, como glucósidos ou glucurónidos na posição 3 (Cabrita et al., 2002).

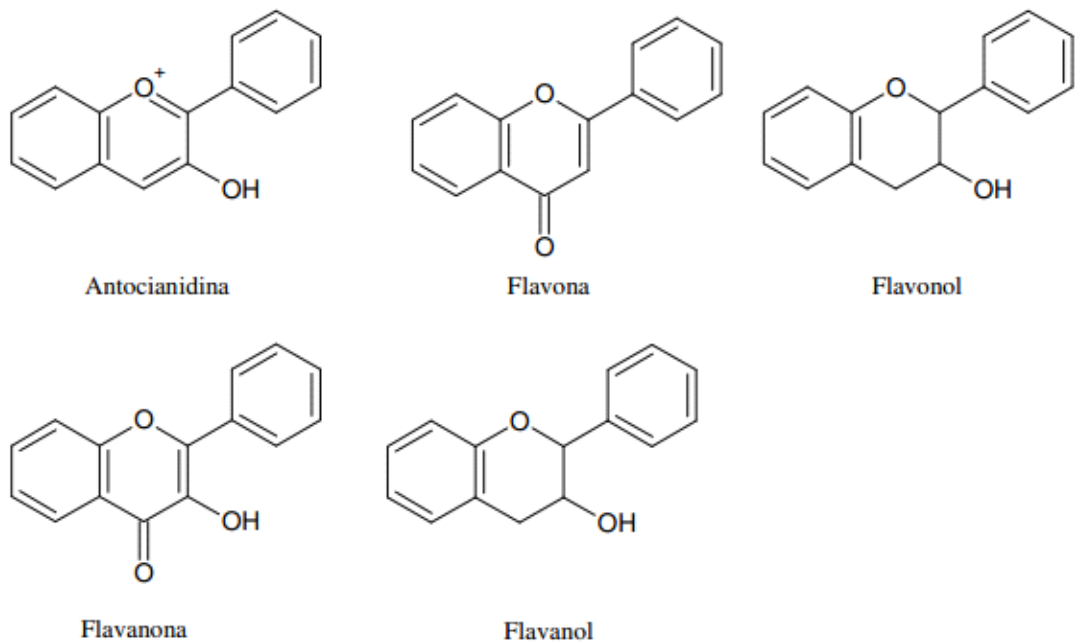
Os flavanóis caracterizam-se por possuírem um anel heterocíclico saturado, sendo moléculas fenólicas relativamente volumosas, resultantes da polimerização de moléculas elementares de função fenol (Cabrita et al., 2002). Segundo a natureza das moléculas elementares, os taninos se distinguem em taninos hidrolisáveis e taninos condensados. A estrutura base dos taninos hidrolisáveis é compreendida por moléculas de ácido gálico e ácido elágico. Já para os taninos condensados, essa estrutura base é formada por (+)-catequina e a (-)-epicatequina (Ribéreau-Gayon et al., 2002).

As antocianinas são responsáveis pela cor das uvas tintas e de seus derivados. São pigmentos de diferentes cores, em tons de vermelho, rosa e violeta (Guerra, 2005). As antocianinas representam uma parte muito importante, quantitativamente e qualitativamente, dos flavonóides das uvas tintas. Elas localizam-se na película e nas três ou quatro primeiras camadas da hipoderme, e também na polpa das variedades tintureiras (Cabrita et al., 2002).

Sua estrutura compreende dois ciclos benzênicos unidos por um heterociclo oxigenado, insaturado e catiônico, o cátion flavilium. Elas diferenciam-se pelo número de grupos hidroxí (oxidrilo) e grau de metilação destes grupos presentes no anel lateral, número e a natureza dos açúcares ligados à molécula, e número e natureza das cadeias alifáticas ou aromáticas esterificadas com os açúcares (Ribéreau-Gayon et al., 2002; Flanzky, 2000). As antocianinas do gênero *Vitis* são a cianidina, a malvidina, a petunidina, a delphinidina e a peonidina. A quantidade relativa de antocianinas varia de acordo com a variedade, mas a malvidina é quase sempre majoritária (Cabrita et al., 2002). Nas variedades viníferas, só se identificam antocianinas monoglicosídicas e antocianinas monoglicosídicas aciladas, com os ácidos *p*-cumárico, cafeico e acético. Já em outras espécies do gênero *Vitis* (*V. riparia*, *V. rupestris*, *V. labrusca*), são encontradas em quantidades consideráveis antocianinas diglicosídicas (Ribéreau-Gayon et al., 2002; Flanzky, 2000). A cor e a reatividade das

antocianinas variam de acordo com suas estruturas químicas e com as condições físico-químicas do meio (Cabrita et al., 2002).

Figura 3. Estrutura base das maiores classes dos flavonóides.



Fonte: Balasundram et al., (2006).

Na videira, as áreas de maior acúmulo de compostos fenólicos são: casca, sementes, polpa e engaço, contendo compostos não flavonóides na polpa e flavonóides na casca, semente e engaço (Flanzy, 2000). Desta maneira, a transformação tecnológica adotada condiciona a extração destes compostos para o suco. Além da tecnologia adotada na elaboração, o tempo de contato com a casca, temperatura, adição de enzimas e outros fatores, como a maturação, o ponto de colheita, a cultivar, fatores edafoclimáticos, o período e a forma de armazenamento podem influenciar a presença dos compostos fenólicos nos vinhos e sucos (Facco, 2008).



### 1.1.2. Composição do suco de uva

A qualidade do suco de uva brasileiro vem se destacando muito e um dos fatores que contribuem para isso é sua elaboração a partir de uvas de espécies americanas (*Vitis labrusca* e outras) como a Concord, Bordô e Isabel, que são extremamente ricas em aroma e sabor, o que os diferencia dos sucos produzidos em países europeus, onde é permitida somente a elaboração de produtos oriundos de uvas finas (*Vitis vinifera*) (Barnabé et al., 2007). Os sucos de uvas provenientes de variedades viníferas têm características aromáticas e gustativas menos intensas, quando comparados aos de variedades americanas (Dani et al., 2008). Em geral, os consumidores apreciam os sucos de uva cujos atributos sensoriais são percebidos em alta intensidade, com equilíbrio entre acidez e açúcar.

Entre as cultivares de uva *Vitis labrusca*, a variedade Concord é a mais utilizada para a produção de suco, devido à sua qualidade, produzindo um suco muito aromático, com boas propriedades nutricionais (Morris e Striegler, 1996; Stalmach et al., 2011).

A variedade Concord é originária de Massachussets, EUA, conhecida também como “Francesa”, “Bergerac” e “Francesa Preta”, sendo muito difundida nos Estados Unidos. É a uva tinta referência de qualidade para suco pelas suas características de aroma e sabor, com alta rusticidade, ocupando uma área de 2.362,57 hectares no Rio Grande do Sul, produzindo 45.822,68 toneladas de uvas em 2012 (Mello et al. 2013). Apresenta dificuldade de adaptação em regiões tropicais, sendo recomendada apenas para regiões onde existe um período de dormência. A Concord é relativamente precoce, medianamente vigorosa e bastante produtiva quando bem manejada (Giovannini, 2008). Diversos estudos clínicos apontam essa variedade como uma fonte rica em compostos fenólicos, tais como flavonoides, antocianinas, ácidos fenólicos, entre outros, que são os principais responsáveis pelos efeitos benéficos à saúde (Krikorian et al., 2010; Rowe et al., 2010; Krikorian et al., 2012).

O suco de uva possui uma composição muito semelhante a do fruto, podendo ser influenciada pela tecnologia de elaboração utilizada, principalmente pelo tempo e temperatura de extração (Rizzon et al., 1998). O principal componente do suco de uva é a água, além disso, o suco apresenta elevado teor de açúcar, como a glicose e a frutose em concentrações semelhantes, variando de 150 a 250 g.L<sup>-1</sup> de açúcar quando utilizado uvas com maturação ideal para a produção do suco (Rizzon et al., 1998; Ribéreau-gayon et al., 2002). O suco de uva destaca-se por apresentar excelente equilíbrio gustativo (doce/ácido), estando essa característica diretamente ligada ao teor de ácidos tartárico (principal ácido da uva), málico e cítrico, que conferem ao suco pH baixo (Rizzon et al., 1998).

Para os minerais, o suco apresenta elevada quantidade de K, e baixa de Na (Rizzon e Miele, 1995). Além desses elementos, Ca, Mg e P são encontrados em concentrações consideráveis, e Fe, Cu, Mn, Zn, Li e Rb são encontrados em concentrações menores, sendo considerados microelementos (Rizzon e Link, 2006). Os sais minerais são importantes para a saúde, pois desempenham funções reguladoras no organismo, tais como o metabolismo de enzimas, o equilíbrio ácido-base e a pressão osmótica (Franco, 1999).

Com relação as vitaminas, substâncias indispensáveis para o desenvolvimento e funcionamento do organismo, no suco de uva encontram-se geralmente vitaminas do complexo B, ácido ascórbico e inositol (Rizzon et al., 1998).

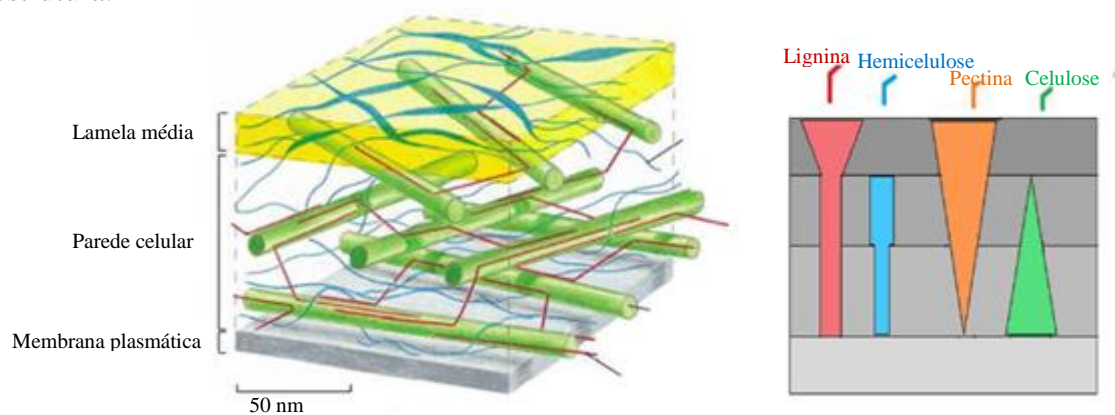
## 1.2. ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR DOS VEGETAIS

A presença de parede celular é uma característica intrínseca às células vegetais (Fig. 4), que se desenvolve durante o seu crescimento e senescência. No início do crescimento vegetativo é formada a parede primária e sua união com as células adjacentes é denominada lamela média. Muitas células depositam cadeias adicionais subsequentemente, formando então a parede secundária (Raven et al., 2007).

Os constituintes da parede celular e da lamela média podem ser classificados em vários tipos de moléculas poliméricas: polissacarídeos pécticos, celulose, hemicelulose e proteínas, as quais variam em conteúdo e estrutura química dependendo da espécie de fruto e do estágio de desenvolvimento (Brownleader et al., 1999).

Entre as funções da parede celular estão a absorção, transporte e secreção de substâncias, sítio de atividade digestiva (vacúolos), proteção contra desidratação, choques mecânicos e defesa contra bactérias e fungos patogênicos (Raven et al., 2007).

Figura 4. Disposição dos principais componentes da parede celular vegetal ao longo da sua estrutura.



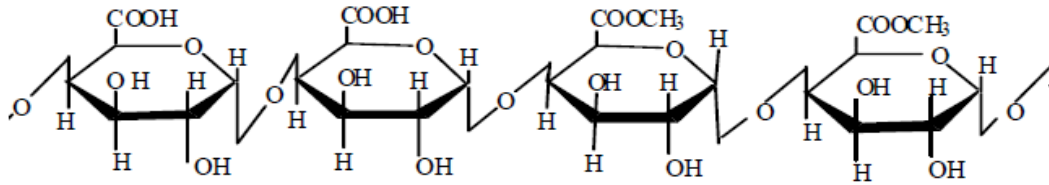
Fonte: Martins (2006).

### 1.2.1. Substâncias pécticas

As substâncias pécticas, também conhecidas como pectina, são polissacarídeos complexos e estão localizadas, principalmente, na lamela média entre as células das plantas superiores, contribuindo para dar firmeza, estrutura aos tecidos e resistência à compressão (James, 1986; Alkorta et al., 1998; Kashyap et al., 2001).

Quimicamente, as substâncias pécticas são formadas por uma cadeia central de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações do tipo  $\alpha$ -1,4 (Fig. 5) (James, 1986; Kashyap et al., 2001).

Figura 5. Estrutura da pectina.



Fonte: Uenojo e Pastore (2007).

Os grupos carboxílicos dos ácidos galacturônicos estão parcialmente esterificados por grupos metil. Com base no tipo de modificações da cadeia principal, as substâncias pécicas são classificadas como (Whitaker, 1984; James, 1986; Alkorta et al., 1998; Kashyap et al., 2001; Jayani et al., 2005; Uenojo e Pastore, 2007):

- Protopectina: As substâncias pécicas insolúveis no tecido intacto são, muitas vezes, referidas como protopectina. A partir da hidrólise da protopectina, as substâncias pécicas solúveis são produzidas, como pectina ou ácido pectínico. A insolubilidade pode estar ligada com o tamanho do polímero ou com a presença de cátions bivalentes, tais como  $\text{Ca}^{2+}$ ;
- Ácido pectico: O ácido pectico é um polímero solúvel em que os grupos metílicos foram removidos das unidades de ácido galacturônico;
- Ácidos pectínicos: O ácido pectínico é um polímero solúvel que possui vários grupos metílicos nas unidades de ácido galacturônico;
- Pectinas: A composição da pectina é variada possuindo o ácido pectínico como o componente principal. É um material polimérico solúvel, em que pelo menos 75 % dos grupos carboxílico dos ácidos galacturônicos se encontram esterificados com grupos metil.

As substâncias pécicas dos tecidos vegetais são de grande importância para a indústria de alimentos, pois possuem efeitos sobre a textura das frutas, como maçãs, pêssegos, tomates e uvas (Whitaker, 1984).

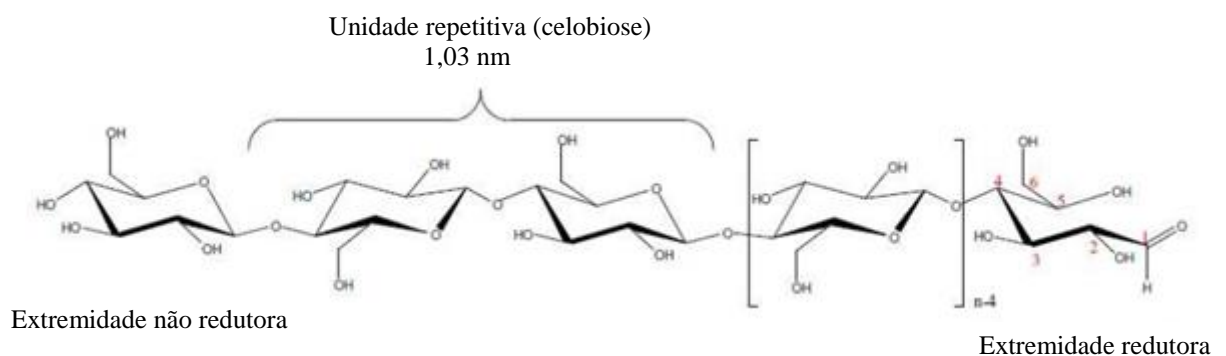
### 1.2.2 Celulose

Na natureza, a celulose é um produto primário da fotossíntese e é essencialmente sintetizada por vegetais, mas também por algumas bactérias e algas (Percival Zhang et al., 2006). Nas plantas, a celulose está associada a outros grupos de polímeros, como hemiceluloses, pectinas e ligninas, o que remete a designação de materiais lignocelulósicos, que são considerados os recursos renováveis mais abundantes na natureza (Han et al., 2004).

A celulose é formada por cerca de 8000 a 12000 resíduos de glicose ligados entre si através de ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas (Saha, 2004), formando microfibrilas com 10 a 25 nm de diâmetro (Raven et al., 2007), sendo encontrada em conteúdos elevados nas paredes celulares, frequentemente na faixa de 35 a 50 % do peso seco da planta (Lynd et al., 2002).

A extremidade da cadeia em que se encontra o carbono anomérico livre é chamada extremidade redutora; a outra extremidade é chamada não redutora (Fig. 6) (Sandgren et al., 2005).

Figura 6. Estrutura molecular da celulose.

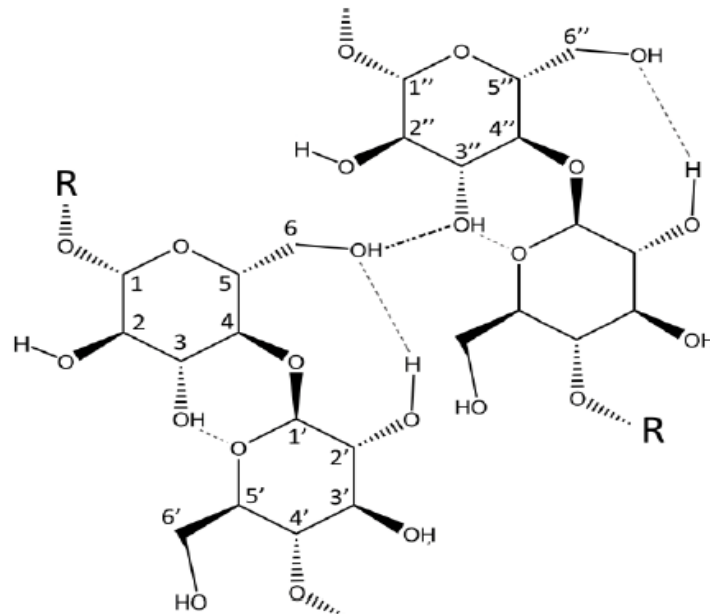


Fonte: Sandgren et al. (2005).

As moléculas de celulose são ligadas entre si devido à presença de grupos hidroxilas na glicose gerando ligações de hidrogênio (Fig. 7). Essas ligações são responsáveis por certas propriedades da celulose, como rigidez da estrutura e grau de cristalização. Em condições

normais, a celulose é extremamente insolúvel em água, o que é necessário para sua função estrutural nas paredes celulares vegetais (Raven et al., 2007).

Figura 7. Representação das ligações moleculares da cadeia de celulose.



Fonte: Lynd et al. (2002).

A celulose apresenta duas regiões: a região cristalina, que implica em uma estrutura mais organizada, possuindo um maior número de interações moleculares através das pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals, o que torna a celulose insolúvel e mais resistente, evitando assim a ação de enzimas, da água e de agentes químicos. Já a região amorfa é a forma mais encontrada na natureza, onde a celulose é mais facilmente hidrolisável, pois as fibras apresentam maior distância uma das outras e menos interações de hidrogênio, sendo facilmente hidratada e mais acessível às enzimas (Lynd et al., 2002; Percival Zhang et al., 2006).

As fibras de celulose na natureza podem ser encontradas desde puramente cristalina até puramente amorfa em todos os graus dentro desta faixa. Esta variação irá influenciar

algumas características físicas e químicas das fibras, como solubilidade, densidade, ponto de fusão, forma do cristal, propriedades elétricas (Lynd et al., 2002).

### 1.3. ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

As pectinases, ou enzimas pectinolíticas, são produzidas por um grande número de bactérias, leveduras, fungos filamentosos, insetos, nematódeos e plantas. Estas enzimas foram umas das primeiras enzimas utilizadas nas indústrias de frutas, tendo sua aplicação comercial observada pela primeira vez em 1930 para a elaboração de vinhos e sucos de frutas (Bhat, 2000; Kashyap et al., 2001).

As pectinases hidrolisam polissacarídeos complexos dos tecidos vegetais em moléculas mais simples, como os ácidos galacturônicos. Dependendo de seu mecanismo de ação, as enzimas podem ser divididas em, despolimerizantes, que agem catalisando o rompimento das ligações  $\alpha$ -1,4 da cadeia principal do polissacarídeo péctico, e desmetoxilantes, que agem desesterificando a pectina a partir do ácido péctico por remoção dos grupos metílicos (Kashyap et al., 2001; Jayani et al., 2005).

A classificação das enzimas pécticas está baseada nos seguintes critérios (Alkorta et al., 1998; Kashyap et al., 2001; Jayani et al., 2005):

- Substrato preferencial: podendo ser a pectina, ácido péctico ou protopectina;
- Ação: modo pela qual a ligação é rompida, podendo agir por trans-eliminação ou hidrólise;
- Clivagem: posição de ataque no substrato podendo ser aleatória (enzima endo-) ou terminal (enzima exo-);

As enzimas despolimerizantes envolvem as hidrolases (catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas) e as liases (catalisam a  $\beta$ -eliminação das ligações glicosídicas) (Fig. 8) (Alkorta et al., 1998).

### 1.3.1. Hidrolases

As hidrolases incluem (Whitaker, 1984; Alkorta et al., 1998; Kashyap et al., 2001; Jayani et al., 2005; Uenojo e Pastore, 2007; Tapre e Jain, 2014):

- Poligalacturonases (PG): atuam sobre o ácido péctico hidrolisando a ligação  $\alpha$ -1,4 entre dois resíduos de ácido galacturônico não esterificados, de forma endo-PG ou exo-PG. As poligalacturonases fúngicas são úteis pela alta atividade enzimática e por possuírem pH ótimo de atividade em condição levemente ácida e temperatura ótima entre 30 e 50 °C. Esta enzima tem mais afinidade por substratos com baixo grau de metilação, havendo a necessidade da utilização de outras enzimas com ação desesterificante para a degradação da pectina;
- Polimetilgalacturonases (PMG): atuam sobre a pectina altamente esterificada por grupos metílicos, não havendo necessidade da ação prévia de outras enzimas desesterificantes. Esta enzima hidrolisa a ligação  $\alpha$ -1,4 dos polimetilgalacturonatos a oligometilgalacturonatos por clivagem de forma endo-PMG ou exo-PMG.

### 1.3.2. Liases

As liases, também chamadas trans-eliminases, incluem (Whitaker, 1984; Alkorta et al., 1998; Kashyap et al., 2001; Jayani et al., 2005; Uenojo e Pastore, 2007; Tapre e Jain, 2014):

- Pectina liases (polimetilgalacturonato liase, PMGL): atuam sobre a pectina, catalisando  $\beta$ -eliminação da ligação  $\alpha$ -1,4 de forma endo-PMGL ou exo-PMGL, resultando em um galacturonato com uma ligação insaturada entre C4 e C5 na extremidade não redutora do ácido galacturônico formado. O pH ótimo é em torno de 5,5 e a temperatura ótima se situa entre 40 e 50 °C. Não necessita de enzimas desesterificantes para a degradação da pectina;



- Pectato liases (poligalacturonato liase, PGL): atuam sobre o ácido pectico, catalisando  $\beta$ -eliminação da ligação  $\alpha$ -1,4 de forma endo-PGL ou exo-PGL, resultando em um galacturonato com uma ligação insaturada entre C4 e C5 na extremidade não redutora do ácido galacturônico formado. Requer  $\text{Ca}^{2+}$  para atividade máxima, tem pH ótimo em condições alcalinas (entre 7,5 e 10) e temperatura ótima entre 40 e 50 °C. Necessita da ação de enzimas desesterificantes para a degradação da pectina.

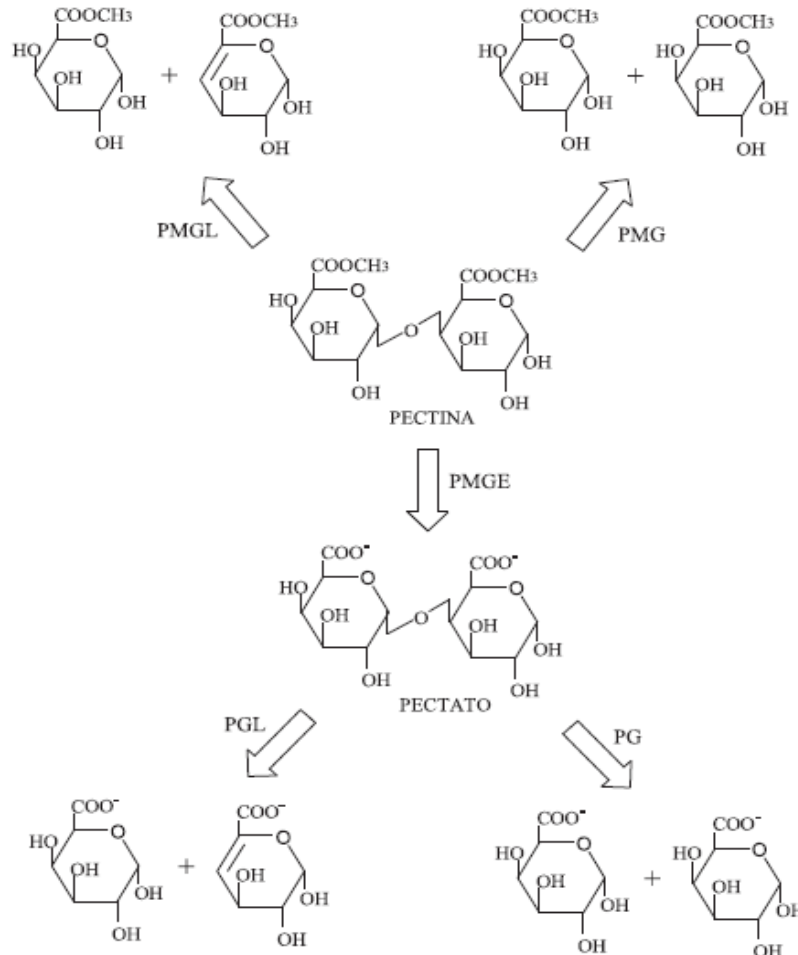
### 1.3.3. Esterases

A pectina metil esterase (polimetilgalacturonato esterase, PME) possui atividade desesterificante ou desmetoxilante, removendo os grupos metílicos e convertendo pectina em pectato (polímero não esterificado) (Jayani et al., 2005; Uenojo e Pastore, 2007). Age preferencialmente no grupo metílico próximo a uma unidade não esterificada (Kashyap et al., 2001). Possui atividade ótima na faixa de pH entre 4 e 8 e temperatura entre 40 e 50 °C. Esta enzima é imprescindível para a ação de outras enzimas, como as poligalacturonases, uma vez que atuam sobre pectina de baixa metoxilação (Alkorta et al., 1998; Jayani et al., 2005).

### 1.3.4. Protopectinases

As protopectinases são responsáveis pela solubilização da protopectina, formando pectina solúvel altamente polimerizada (Kashyap et al., 2001). Com base nas suas aplicações, são principalmente de dois tipos: a protopectinase tipo A (PPase-A), que reage com o sítio interno, na região do ácido poligalacturônico da protopectina e a protopectinase tipo B (PPase-B) que reage com o sítio externo, nas cadeias de polissacarídeos que podem estar conectadas às cadeias de ácido poligalacturônico (Jayani et al., 2005; Uenojo e Pastore, 2007). Não são muito abundantes e possuem pouco interesse industrial na degradação da pectina (Alkorta et al., 1998).

Figura 8. Ação enzimática das pectinases em uma molécula de pectina. PMGL: pectina liase. PMG: polimetilgalacturonase; PMGE: pectina metil esterase; PGL: pectato liase; PG: poligalacturonase.



Fonte: Uenojo e Pastore (2007); Alkorta et al. (1998).

#### 1.4. ENZIMAS CELULOLÍTICAS

As celulasas são enzimas responsáveis pela degradação da celulose, promovendo a hidrólise das ligações químicas existentes entre as unidades de glicose. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares (Lynd et al., 2002; Castro e Pereira Jr, 2010).

As celulasas são produzidas por diversas bactérias e fungos, aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos. Os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* são os principais produtores das enzimas celulasas (Bhat, 2000).

A classificação das celulasas é de acordo com a posição de ataque no substrato, dividindo-as em três grandes grupos (Wright et al., 1988; Bhat e Bhat, 1997; Lynd et al., 2002):

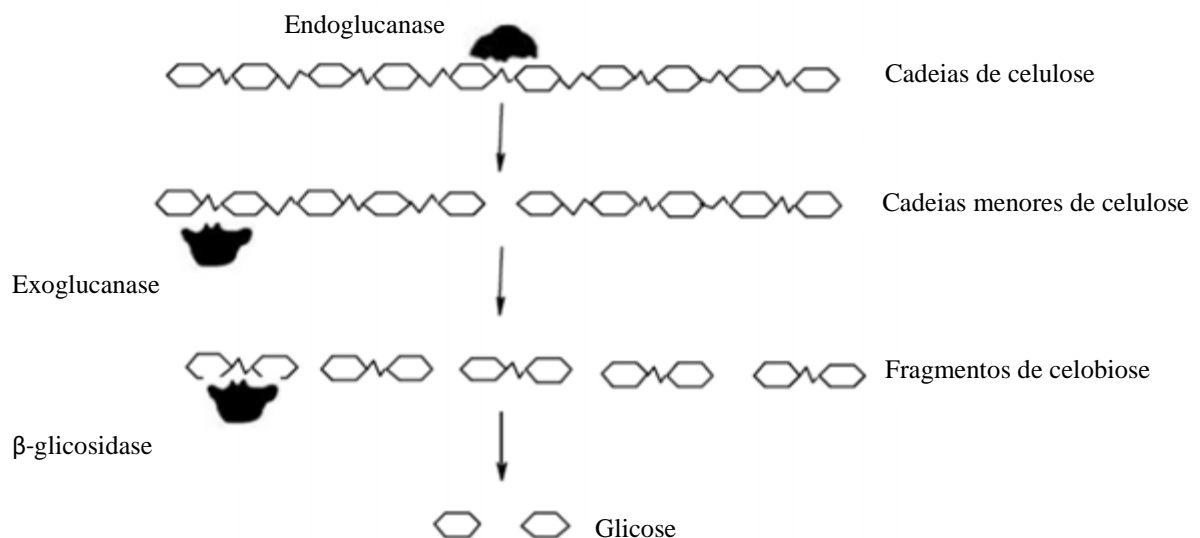
- Endoglucanases: são também conhecidas como endo- $\beta$ -1,4 glicanases e carboximetil celulasas. Catalisam a hidrólise interna de ligações  $\beta$ -1,4-D-glicosídicas da celulose, liberando compostos menores formados por poucas unidades de glicose, os chamados oligossacarídeos. Atuam somente na porção amorfa da celulose, sendo que sua atividade diminui conforme o encurtamento da cadeia;
- Exoglucanases: agem nas extremidades das fibras de celulose e liberam unidades de glicose (glicanohidrolases) ou celobiose (celobiohidrolases), que são compostos menores, formados por duas unidades de glicose. As glicanohidrolases são responsáveis pela remoção sucessiva de unidades de glicose na ligação  $\beta$ -1,4-D-glicosídica. Já as celobiohidrolases catalisam a hidrólise de ligações  $\beta$ -1,4-D-glicosídicas, liberando celobiose;
- $\beta$ -glicosidases: agem hidrolisando a ligação  $\beta$ -1,4-D-glicosídicas existente entre as duas unidades de glicose que formam a celobiose, liberando unidades de glicose. Diminuem sua atividade com o aumento da extensão da cadeia de celulose ou na presença de altas concentrações de glicose.

É proposto que as enzimas necessitam estar adsorvidas sobre o substrato insolúvel para dar início a hidrólise enzimática. A estrutura ordenada do substrato (região cristalina) é perdida aumentando a desordem molecular das regiões compactas, expondo as cadeias celulósicas do interior das microfibrilas. Uma vez exposto às cadeias de celulose dá-se início à ação enzimática, que por sinergismo, as endoglucanases promovem o rompimento das ligações  $\beta$ -1,4-D-glicosídicas em oligossacarídeos solúveis com grau de polimerização menor que 6 unidades. Esses oligossacarídeos solúveis são rapidamente hidrolisados pelas

exoglucanases, formando em sua maioria celobiose, que pela ação das  $\beta$ -glicosidases são convertidas em glicose (Arantes e Saddler, 2010).

Quando atuam conjuntamente, as enzimas do complexo celulósico apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais (Wright et al., 1988), como mostra a Fig. 9. O grau de sinergismo varia conforme o tipo de celulose utilizada, na presença de celulose cristalina o sinergismo endo-exo é alto, diminui na celulose amorfa e é muito baixo ou ausente em derivados solúveis da celulose, como a carboximetilcelulose (CMC) (Bhat e Bhat, 1997).

Figura 9. Ação das enzimas celulases sobre a molécula de celulose.



Fonte: Wright et al. (1988).

### 1.5. APLICAÇÃO DE ENZIMAS EM SUCOS

Preparados enzimáticos comerciais utilizados na produção de suco são constituídos de um complexo de enzimas pectinolíticas e celulolíticas que atuam de modos diferentes, catalisando a hidrólise dos polissacarídeos das frutas (Sankaran et al., 2015). Na produção de suco de uva, a adição de preparados enzimáticos durante a maceração, antes da prensagem, é um pré-requisito para a obtenção de satisfatórios rendimentos de suco. Além disso, a

degradação catalisada por enzimas das paredes celulares ajuda a liberar compostos bioativos, aumentando assim a recuperação de fenóis e antocianinas, que de outro modo seriam perdidos com os resíduos de prensagem (Sowbhagya e Chitra, 2010). Estes compostos são normalmente encontrados nas cascas das uvas, exigindo, portanto, uma etapa de maceração, necessitando que ocorra a degradação da lamela média e das paredes celulares para permitir que o seu conteúdo seja extraído (Bautista-Ortín et al., 2005). A porosidade desta barreira pode ser aumentada pela hidrólise parcial dos polissacarídeos (pectina, hemicelulose, celulose), utilizando enzimas de maceração (Romero-Cascales et al., 2012).

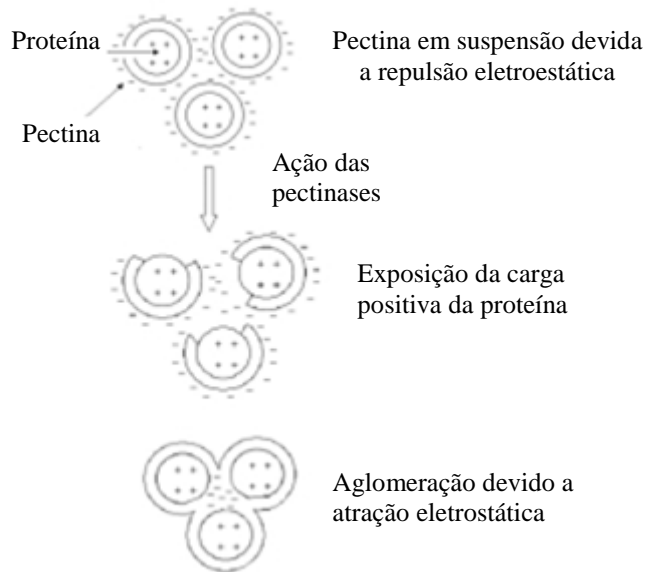
Um fator determinante para o alto rendimento do suco é a seleção adequada da atividade enzimática na maceração (Alkorta et al., 1998; Lei e Bi, 2007). Segundo Mieszczakowska-Fraç et al. (2012), o aumento da proporção de pectina liase e pectina metil esterase na maceração influenciam positivamente o rendimento do suco.

Algumas enzimas utilizadas na indústria de alimentos e vinhos, com suas respectivas funções, são apresentadas na tabela 1. Na indústria de sucos de frutas, estas enzimas são utilizadas para melhorar a qualidade sensorial, proporcionando sucos mais claros e, além disso, facilita os processos de filtração, clarificação e estabilização dos produtos (Pinelo et al., 2010; Khandare et al., 2011; Sandri et al., 2011; Romero-Cascales et al., 2012). A etapa de prensagem das frutas provoca um rompimento das paredes celulares do mesocarpo levando à liberação do mosto (Lea, 1995). Esta etapa pode gerar alguns problemas como excesso de viscosidade e turbidez pela formação de partículas insolúveis, podendo dificultar o processamento (Kashyap et al., 2001). Essa turbidez pode ser encontrada nos sucos de frutas em diferentes graus, especialmente devido à presença dos polissacarídeos (pectina, celulose, hemicelulose, lignina e amido) (Whitaker, 1984; Vaillant et al., 2001).

As substâncias pécticas que formam a turbidez do suco, contem um núcleo proteico com carga positiva, revestido por moléculas de pectina com carga negativa (Pilnik e Voragen,

1993). Esta carga negativa faz com que as moléculas de pectina sejam repelidas uma das outras. As pectinases atuam degradando a pectina e expõem parte da proteína carregada positivamente, reduzindo assim a repulsão eletrostática e proporcionando a agregação em partículas maiores (complexo pectina-proteína) que irão sedimentar (Fig. 10) (Pilnik e Voragen, 1993; Lea, 1995). Para melhorar o processo de sedimentação, podem ser utilizados agentes floculantes, como gelatina, tanino ou bentonite. Posteriormente, os processos de centrifugação e de filtração podem ser necessários para dar ao suco uma aparência límpida e clara que muitos consumidores preferem (Kashyap et al., 2001).

Figura 10. Mecanismo de formação do complexo pectina-proteína.



Fonte: Adaptado de Pilnik e Voragen (1993).

Dentre as celulases, as  $\beta$ -glicosidasas possuem capacidade de liberar compostos aromáticos durante a fabricação do vinho, como terpenos, compostos fenólicos com capacidade antioxidante, propriedades nutracêuticas e flavorizante (Daroit et al., 2007). A utilização de  $\beta$ -glicosidasas em conjunto com pectinases faz com que aromas e características voláteis de frutas e vegetais aumentem, o que é de grande importância para a indústria de alimentos (Bhat, 2000).

Tabela 1. Funções e aplicações de enzimas na indústria de alimentos e de vinhos.

ENZIMA	FUNÇÃO	APLICAÇÃO
Enzima de maceração (pectinases, celulasas e hemicelulasas)	Hidrólise de pectina solúvel e de componentes de parede celulares, diminuição de viscosidade e manutenção de textura de sucos de frutas	Melhoramento na extração de sucos de frutas e óleo de oliva, liberação de aromas, enzimas, proteínas, polissacarídeos, amido e ágar
Pectinase ácida e termo-estável como poligalacturonase, pectina esterase e pectina transeliminase	Rápida diminuição de viscosidade e hidrólise dos tecidos vegetais	Melhora o rompimento da fruta e aumenta a extração de pigmentos de cor
Poligalacturonase com alta atividade de pró-pectinase e baixa celulase	Hidrólise parcial de pró-pectina	Produção de purês com alta viscosidade
Poligalacturonase e pectina trans-eliminase com baixa atividade de pectina esterase e hemicelulase	Hidrólise parcial de pró-pectina e de pectina solúvel em fragmentos de tamanho médio, formação de precipitado e remoção de hidrocolóides de celulose	Produção de sucos vegetais não clarificados de baixa viscosidade
Poligalacturonase, pectina trans-eliminase e hemicelulase	Hidrólise completa de pectina e de polissacarídeos ramificados	Clarificação de sucos de frutas
Pectinase e $\beta$ -glicosidade	Infusão de pectinase e glicosidase para facilitar o descascamento e melhorar a firmeza de frutas	Alteração das propriedades sensoriais de frutas e vegetais
Pectina esterase com atividade de poligalacturonase e de pectina liase	Processamento de frutas	Produção de ketchup de alta qualidade e de polpa de frutas
Pectina esterase	Desesterificação e geleificação de pectina	Melhoramento na clarificação de sidra
Enzima de maceração (pectinases, celulasas e hemicelulasas)	Hidrólise de polissacarídeos das paredes celulares vegetais	Melhoramento da maceração da casca e extração de pigmentos de cor das uvas, qualidade, estabilidade, filtração e clarificação dos vinhos

Fonte: Uenojo e Pastore (2007).

## 1.6. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

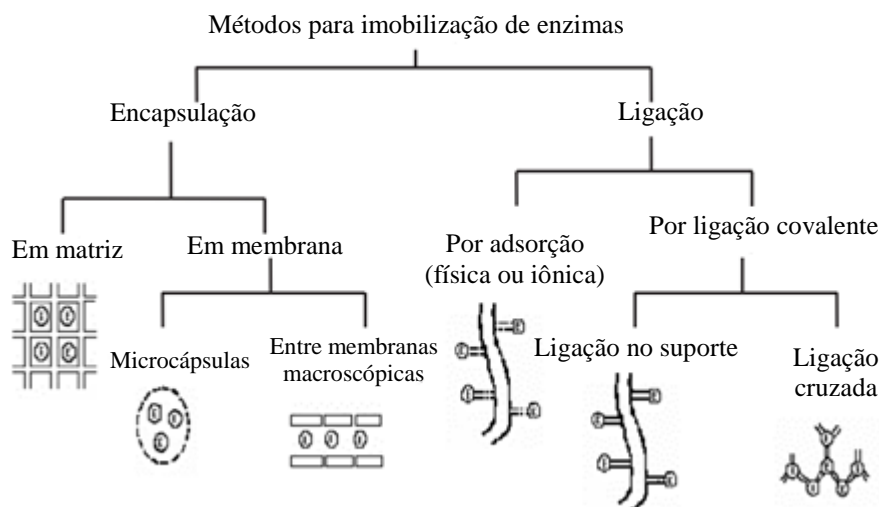
As enzimas são moléculas complexas, altamente sensíveis, com estruturas tridimensionais que são essenciais para as suas atividades. A exposição a determinadas condições do meio de reação, tais como temperatura elevada ou baixo pH, pode levar à desnaturação e a perda da sua atividade. Além disso, as enzimas são geralmente usadas na forma de soluções, dificultando a sua recuperação e reutilização, podendo também gerar uma contaminação do produto (Sheldon, 2011). Estas desvantagens podem ser contornadas pela utilização de enzimas imobilizadas.

Enzimas imobilizadas podem ser definidas como aquelas fisicamente retidas, normalmente em uma matriz sólida, com manutenção da sua atividade catalítica, podendo ser utilizadas continuamente (Garcia-Galan et al., 2011). Em geral, a imobilização oferece uma série de vantagens, incluindo: possibilidade de uso da enzima por um maior período de tempo; possibilidade de operação em modo contínuo, com maior controle do processo; facilidade de separação do produto final e de interrupção da reação pela simples remoção da enzima, caso o processo seja em batelada, ou ajuste do tempo de residência em reatores contínuos. Além disso, em alguns casos, ocorre modificação favorável das propriedades catalíticas da enzima, conferindo maior estabilidade frente às condições adversas da reação, como faixas extremas de pH e temperatura (Guisán, 2006; Hanefeld et al., 2009; Klein et al., 2013; Liese e Hilterhaus, 2013; Asgher et al., 2014).

Várias metodologias podem ser aplicadas para imobilizar enzimas, como por exemplo, a encapsulação, a adsorção em materiais insolúveis como resinas de troca iônica, a copolimerização com monômeros ou a ligação a uma matriz insolúvel por ligações covalentes (Fig. 11) (Dalla-Vecchia et al., 2004; Guisán, 2006; Romaškevič et al., 2006; Hanefeld et al., 2009).



Figura 11. Métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: Dalla-Vecchia et al. (2004).

### 1.6.1. Agregados enzimáticos entrecruzados

Agregados de enzima entrecruzados (CLEAs, do inglês *cross-linked enzyme aggregates*) ganharam considerável atenção industrial como uma alternativa aos métodos convencionais de imobilização em suportes sólidos, destacando-se por ser um processo simples, rápido e econômico (Cao et al., 2003; Sheldon, 2011). A preparação de CLEAs apresenta vantagens como alta retenção de atividade, estabilidade mecânica, estabilidade frente às condições da reação, estabilidade de armazenamento, baixos custos de produção, excelente capacidade de recuperação, além de não haver necessidade de purificação prévia das enzimas (Wilson et al., 2004; Sheldon, 2011; Bhattacharya e Pletschke, 2014; Nadar et al., 2016).

Os CLEAs são normalmente preparados por precipitação da enzima com adição de agentes precipitantes específicos como solventes orgânicos, polímeros não-iônicos e sais inorgânicos, seguido por ligação cruzada com um agente de entrecruzamento bifuncional (Cao et al., 2003; Garcia-Galan et al., 2011; Cruz et al., 2012). Os agentes de precipitação proporcionam uma agregação física das moléculas de enzima em grandes estruturas moleculares, sem perturbação da estrutura tridimensional original da proteína. Estes

agregados sólidos são mantidos por ligação não covalente e facilmente se redissolvem, quando dispersos em meio aquoso. Assim, a etapa de entrecruzamento é necessária para estabilizar os agregados por ligações covalentes, no qual as moléculas de enzimas são ligadas quimicamente umas às outras por um reagente bifuncional através da reação de grupos amino de resíduos de lisina presentes na superfície externa da enzima, tornando os agregados permanentemente insolúveis (Sheldon, 2007; Kartal et al., 2011; Sheldon, 2011; Talekar et al., 2013).

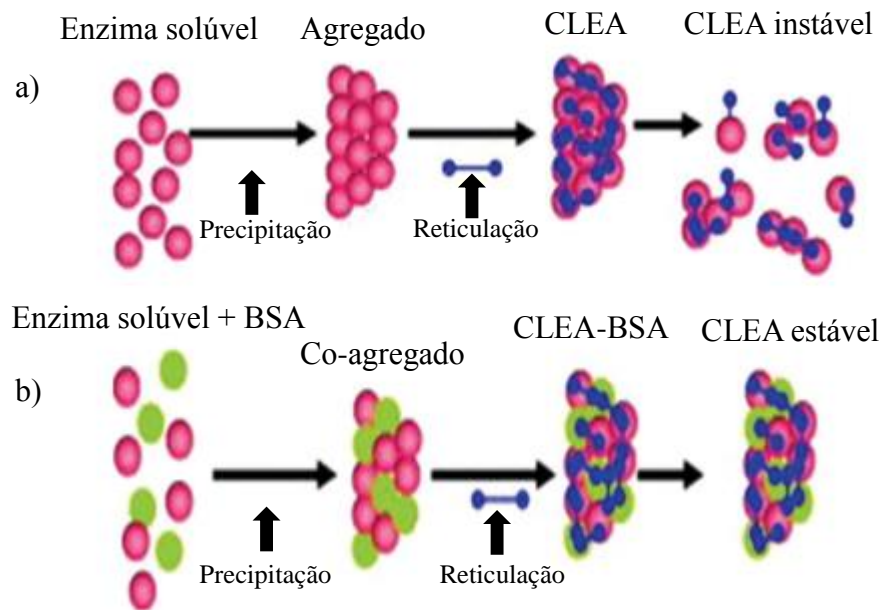
O agente de entrecruzamento, bem como a sua concentração, tem papel muito importante para a atividade, estabilidade e tamanho dos CLEAs. Geralmente, o glutaraldeído tem sido amplamente utilizado devido ao seu baixo custo, facilidade de manuseio e a capacidade de formar ligações covalentes com os resíduos de aminoácidos reativos na superfície de numerosas enzimas (Barbosa et al., 2014). No entanto, em baixas concentrações de proteína no extrato bruto, ou com enzimas contendo poucos resíduos de lisina na sua superfície, ou ainda quando a atividade da enzima é sensível ao glutaraldeído, o entrecruzamento pode não ser eficaz, resultando em CLEAs com baixa estabilidade mecânica, lixiviando enzimas para o meio de reação e com baixa atividade catalítica pela ligação do glutaraldeído aos grupamentos amino essenciais do sítio ativo (Talekar et al., 2013). Como uma opção para resolver esses problemas, Lopez-Gallego et al., (2005) e Shah et al., (2006) propuseram a adição de um polímero e albumina de soro bovino (BSA), respectivamente, contendo vários grupos amino livres na preparação de CLEAs altamente estáveis (Fig. 12). Embora as enzimas estudadas tivessem um número reduzido de grupos amino na superfície, os grupamentos amino do polímero e da BSA proporcionaram um adequado entrecruzamento entre estes aditivos e as moléculas de enzimas resultando em elevadas atividades recuperadas.

A preparação dos CLEAs é um processo bastante complexo e demorado. Qualquer fator que pode alterar a precipitação da proteína ou o entrecruzamento do agregado pode

afetar o tamanho de partícula, a estabilidade e a recuperação da atividade (Yu et al., 2006). O tamanho de partícula é uma propriedade importante no contexto de aplicações industriais, uma vez que afeta diretamente a transferência de massa e a separação do meio reacional sob as condições operacionais (Talekar et al., 2013). Um tamanho típico das partículas dos CLEAs é de 5 µm a 50 µm. Igualmente como acontece com todos os catalisadores sólidos, pode-se esperar perda de atividade devido às limitações difusionais. No entanto, os CLEAs são altamente porosos, o que facilita o acesso do substrato ao sítio ativo das enzimas no interior dos CLEAs (Sheldon, 2011).

Alguns estudos também têm demonstrado que os CLEAs podem catalisar uma sequência de reações, sendo chamados de combi-CLEAs. Nos combi-CLEAs, populações heterogêneas de enzimas podem ser simultaneamente confinadas no mesmo agregado, podendo desempenhar a bioconversão em cascata ou não, melhorando desse modo as interações sinérgicas entre as diferentes enzimas na catálise (Taboada-Puig et al., 2011; Jung et al., 2013; Bhattacharya e Pletschke, 2015). Processos catalíticos em cascata têm grande potencial no contexto da produção industrial (Bruggink et al., 2003), envolvendo menos operações unitárias, reatores menores, maiores rendimentos volumétricos e de espaço/tempo, tempos de ciclo mais curtos e que geram menos resíduos em comparação com os processos convencionais de múltiplas etapas (Sheldon, 2011). Essa possibilidade da preparação dos combi-CLEAs com diferentes enzimas no mesmo agregado é uma característica interessante para a aplicação em sucos, visto que são várias enzimas atuando em conjunto na degradação dos polissacarídeos.

Figura 12. Produção de CLEAs com enzimas deficientes em grupamentos amino (a) e com adição de BSA (b).



Fonte: Adaptado de Talekar et al. (2013).

## CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. MATERIAIS

#### 2.1.1. Uvas

Para a realização dos experimentos foram utilizadas as uvas da variedade Concord doadas pela Vitivinícola Jolimont (Canela, RS). Prévio ao processamento, as uvas foram higienizadas com uma solução de NaClO (1 %) por 15 min e lavadas com água potável. Após foram armazenadas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o processamento.

#### 2.1.2. Enzimas

As preparações enzimáticas utilizadas foram a Pectinex® Ultra SP-L, Pectinex® Ultra Color, Pectinex® Smash XXL, Novozym® 33095, Pectinex® Ultra Clear, Pectinex® BE XXL, doadas pela Novozymes (Espanha). O preparado Rohapect® 10L foi doado pela Amazon Group (Brasil) e o preparado Lallzyme® Beta foi doado pela Lallemand Wine (França). Na Tabela 1 são mostradas, para cada preparado, as enzimas e atividades declaradas pelos fornecedores, bem como os microrganismos de origem. Cabe ressaltar que estas atividades são ilustrativas e que todos preparados foram caracterizados de acordo com as atividades descritas nas seções 2.4.1 a 2.4.5.

Como será visto ao longo do trabalho, cada preparação enzimática possui uma composição enzimática própria, mas todas são indicadas, pelos seus fabricantes, para o uso na produção de sucos e vinhos, com diversas finalidades, como por exemplo, na redução da viscosidade, no aumento da extração, no melhoramento dos processos de prensagem e filtração e no aumento de compostos aromáticos, buscando agregar qualidade ao produto.

Tabela 1. Principais enzimas, atividades e microrganismo declarado pelos fabricantes.

<b>Preparados Enzimáticos</b>	<b>Enzimas Declaradas</b>	<b>Atividades Declaradas</b>	<b>Microrganismo produtor</b>
Pectinex® Ultra SP-L	Poligalacturonase	9500 PGU.mL <sup>-1</sup>	<i>Aspergillus aculeatus</i>
Pectinex® Ultra Color	Pectina liase Poligalacturonase	10000 PECTU.mL <sup>-1</sup>	<i>A. aculeatus</i> <i>A. niger</i>
Pectinex® Smash XXL	Pectina liase	30000 UPTE.mL <sup>-1</sup>	<i>A. niger</i>
Novozym® 33095	Pectina liase Poligalacturonase	10000 PECTU.mL <sup>-1</sup>	<i>A. aculeatus</i> <i>A. niger</i>
Pectinex® Ultra Clear	Poligalacturonase	7900 PGNU.mL <sup>-1</sup>	<i>A. niger</i> <i>A. aculeatus</i>
Pectinex® BE XXL	Pectina liase Poligalacturonase	16000 PECTU.mL <sup>-1</sup>	<i>A. niger</i>
Rohapect® 10L	Complexo de pectinases	70000 ADJU.mL <sup>-1</sup>	<i>A. niger</i>
Lallzyme® Beta	Pectina liase Pectina metil esterase Poligalacturonase	5 U.g <sup>-1</sup> 180 U.g <sup>-1</sup> 590 U.g <sup>-1</sup>	<i>A. niger</i>

### 2.1.3. Reagentes

Os reagentes utilizados para as diversas análises foram os seguintes: pectina (75 % grau de esterificação), ácido poligalacturônico, ácido galacturônico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cumárico, quercetina, cianidina e trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), os quais foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. Ltd. (São Paulo, Brazil). Ácido fórmico, acetonitrila, metanol de grau HPLC foram adquiridos da Panreac Quimica SL (Barcelona, Espanha). Todos os outros solventes e produtos químicos foram de grau analítico ou grau HPLC.

## 2.2. EXTRAÇÃO DO SUCO DE UVA

Os sucos foram preparados no Laboratório de Biocatálise e Tecnologia Enzimática do ICTA/UFRGS. O processamento do suco foi desenvolvido no laboratório, sendo realizado conforme o fluxograma do Apêndice A. Primeiramente para a extração do suco, as uvas, anteriormente higienizadas, foram desengaçadas e homogeneizadas manualmente, seguindo para os passos abaixo:

- 100 g de bagas de uva foram pesadas e suavemente esmagadas com auxílio de um pistilo;
- 1 mL da preparação enzimática, diluída e padronizada com base na sua atividade de pectinase total, foi misturado às uvas esmagadas;
- Incubação durante um determinado tempo e temperatura, variando conforme o experimento, sob constante agitação;
- Prensagem dos sucos;
- Análise e armazenamento a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Como tratamento controle, utilizou-se uma amostra sem enzima que foi submetida ao mesmo procedimento. O rendimento de suco de uva foi calculado de acordo com a Equação 1:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{massa de suco}}{\text{massa inicial de uvas}} \times 100 \quad (1)$$

### **2.2.1. Planejamento experimental para a extração do suco de uva**

Um delineamento composto central  $2^4$  (DCC) foi utilizado para determinar as condições ótimas para maximizar o rendimento de suco que foi analisado através Equação 1, e extração de compostos antioxidantes, sendo analisado através da capacidade redutora (Item 2.4.12.). Quatro variáveis independentes foram selecionados: temperatura, tempo, concentração de enzima e razão Pectinex® Ultra Clear/Lallzyme® Beta (PUC/LB). O planejamento consistiu de dezesseis pontos fatoriais, oito pontos axiais, e quatro repetições no ponto central, gerando 28 tratamentos como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Planejamento experimental para otimização da extração do suco de uva.

Experimentos	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração de enzima (U.g <sup>-1</sup> )	Razão PUC/LB
1	-1 (40)	-1 (30)	-1 (0.325)	-1 (0.25)
2	-1 (40)	-1 (30)	-1 (0.325)	1 (0.75)
3	-1 (40)	-1 (30)	1 (0.775)	-1 (0.25)
4	-1 (40)	-1 (30)	1 (0.775)	1 (0.75)
5	-1 (40)	1 (60)	-1 (0.325)	-1 (0.25)
6	-1 (40)	1 (60)	-1 (0.325)	1 (0.75)
7	-1 (40)	1 (60)	1 (0.775)	-1 (0.25)
8	-1 (40)	1 (60)	1 (0.775)	1 (0.75)
9	1 (60)	-1 (30)	-1 (0.325)	-1 (0.25)
10	1 (60)	-1 (30)	-1 (0.325)	1 (0.75)
11	1 (60)	-1 (30)	1 (0.775)	-1 (0.25)
12	1 (60)	-1 (30)	1 (0.775)	1 (0.75)
13	1 (60)	1 (60)	-1 (0.325)	-1 (0.25)
14	1 (60)	1 (60)	-1 (0.325)	1 (0.75)
15	1 (60)	1 (60)	1 (0.775)	-1 (0.25)
16	1 (60)	1 (60)	1 (0.775)	1 (0.75)
17	-2 (30)	0 (45)	0 (0.55)	0 (0.5)
18	2 (70)	0 (45)	0 (0.55)	0 (0.5)
19	0 (50)	-2 (15)	0 (0.55)	0 (0.5)
20	0 (50)	2 (75)	0 (0.55)	0 (0.5)
21	0 (50)	0 (45)	-2 (0.1)	0 (0.5)
22	0 (50)	0 (45)	2 (1.0)	0 (0.5)
23	0 (50)	0 (45)	0 (0.55)	-2 (0)
24	0 (50)	0 (45)	0 (0.55)	2 (1.0)
25	0 (50)	0 (45)	0 (0.55)	0 (0.5)
26	0 (50)	0 (45)	0 (0.55)	0 (0.5)
27	0 (50)	0 (45)	0 (0.55)	0 (0.5)
28	0 (50)	0 (45)	0 (0.55)	0 (0.5)

## 2.2. PREPARAÇÃO DOS COMBI-CLEAS

A preparação dos combi-CLEAs seguiu a metodologia proposta por Schoevaart et al. (2004) com modificações, através das seguintes etapas:

- Precipitação de enzima com agente precipitante na proporção de 1:9 v/v de enzima/precipitante;
- Adição de glutaraldeído (mM) e BSA (mg.mL<sup>-1</sup>) (as concentrações variaram conforme o experimento);



- Agitação suave em homogeneizador de rolos horizontal, onde ficou por um tempo determinado conforme o experimento, a temperatura ambiente;
- Centrifugação dos CLEAs a  $3000 \times g$  por 5 min;
- Separação do sobrenadante para a retirada do agente precipitante;
- Lavagem dos combi-CLEAs com tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8); seguido de centrifugação a  $3000 \times g$  por 5 min, retirando o sobrenadante. Essa operação de lavagem foi realizada três vezes para retirada das enzimas não covalentemente ligadas e do excesso de glutaraldeído;
- Ressuspensão dos CLEAs em tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8);
- Análise e armazenamento a 4 °C.

Atividade recuperada foi calculada de acordo com a Equação 2:

$$RA (\%) = \frac{\text{Total pectinase activity in CLEAs (U)}}{\text{Initial pectinase activity (U)}} \times 100 \quad (2)$$

### 2.2.1. Seleção do agente precipitante

A fim de escolher o melhor agente de precipitação para a preparação dos combi-CLEAs, foi verificada a influência de cinco agentes precipitantes (acetona, etanol, álcool isopropílico, terc-butanol e sulfato de amônio saturado) foi avaliada, através das seguintes etapas:

- 0,1 mL de enzima diluída foi adicionado a 0,9 mL do solvente orgânico;
- Agitação suave em homogeneizador de rolos horizontal durante 4 horas à temperatura ambiente;
- Centrifugação por  $3000 \times g$  durante 5 min;
- Remoção do sobrenadante para a retirada do agente precipitante;
- Ressuspensão da enzima precipitada em tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8);

- Medição da atividade recuperada (Equação 2)

### 2.2.2. Planejamento experimental para a preparação dos combi-CLEAs

Um delineamento composto central (DCC) com duas variáveis variando em cinco níveis foi realizado, a fim de se obter as condições ótimas para a preparação dos combi-CLEAs. Duas variáveis independentes foram analisadas: concentração de glutaraldeído e tempo de reação e como resposta foi determinado atividade recuperada (Equação 2) e atividade de pectinase total (item 2.4.1.). O planejamento consistiu de quatro pontos fatoriais, quatro pontos axiais, e três repetições no ponto central, gerando 11 tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3. Planejamento experimental para otimização do preparo dos combi-CLEAs.

Experimentos	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>
	Glutaraldeído (mM)	Tempo (h)
1	-1 (46)	-1 (4)
2	-1 (46)	1 (14)
3	1 (174)	-1 (4)
4	1 (174)	1 (14)
5	-1,41 (20)	0 (9)
6	1,41 (200)	0 (9)
7	0 (110)	-1,41 (2)
8	0 (110)	1,41 (16)
9	0 (110)	0 (9)
10	0 (110)	0 (9)
11	0 (110)	0 (9)

### 2.2.3. Determinação do pH e da temperatura ótima

Um delineamento de composto central (DCC) com duas variáveis variando em cinco níveis foi realizado para encontrar as condições ótimas de atividade enzimática para a enzima solúvel, combi-CLEAs e combi-CLEAs-BSA. Duas variáveis independentes foram analisadas: temperatura e pH, e como resposta foi determinado atividade de pectinase total (item 2.4.1.) O planejamento consistiu de quatro pontos fatoriais, quatro pontos axiais, e três repetições no ponto central, gerando 11 tratamentos para cada enzima (Tabela 4).

Tabela 4. Planejamento experimental para determinação do pH e temperatura ótimos de atividade para a enzima solúvel, combi-CLEAs e combi-CLEAs-BSA.

Experimentos	X <sub>1</sub> Temperatura (°C)	X <sub>2</sub> pH
1	-1 (36)	-1 (3.4)
2	-1 (36)	1 (5.6)
3	1 (64)	-1 (3.4)
4	1 (64)	1 (5.6)
5	-1,41 (30)	0 (4.5)
6	1,41 (70)	0 (4.5)
7	0 (50)	-1,41 (3.0)
8	0 (50)	1,41 (6.0)
9	0 (50)	0 (4.5)
10	0 (50)	0 (4.5)
11	0 (50)	0 (4.5)

#### 2.2.4. Avaliação da estabilidade térmica e estabilidade ao pH

A estabilidade térmica foi avaliada como descrito por Lorenzoni et al. (2014) com modificações, através da incubação das enzimas em tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) a 50 °C durante 150 min. Periodicamente, amostras foram retiradas e a atividade de pectinase total foi medida. A inativação térmica foi descrita por uma Equação de primeira ordem:

$$\frac{A}{A_0} = \exp(-kt) \quad (3)$$

onde  $A$  é atividade enzimática no tempo  $t$ ,  $A_0$  é atividade enzimática inicial,  $t$  é o tempo de tratamento, e  $k$  é a taxa de inativação constante na temperatura estudada. Os tempos de meia-vida das enzimas ( $t_{1/2}$ ) representam os tempos necessários para que as enzimas percam 50 % da sua atividade inicial, sendo calculados a partir dos valores de  $k$ , com a seguinte Equação:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (4)$$

A estabilidade ao pH foi avaliada através da incubação das enzimas próximo ao pH do suco (pH 3,5), em tampão citrato de sódio (50 mM, pH 3,5) a 4 °C. Periodicamente, amostras foram retiradas e atividade de pectinase total foi medida.

### 2.2.5. Estabilidade operacional

A estabilidade operacional dos combi-CLEAs e dos combi-CLEAs-BSA foi avaliada através da hidrólise da pectina, através das seguintes etapas:

- 2 U de pectinase total foram adicionadas a 1,0 mL de substrato (1 g.L<sup>-1</sup> de pectina) em tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8);
- Incubação a 37 °C durante 15 min, sob agitação;
- Centrifugação dos combi-CLEAs e combi-CLEAs-BSA (3000 × g por 5 min);
- Lavagem com tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8);
- Nova incubação com 1 mL de substrato, dando início a um novo ciclo.

A concentração do produto formado depois de cada ciclo foi determinada através da curva de calibração construída com soluções de glicose (Vetec), entre 0,2 a 1,2 mg.L<sup>-1</sup>, analisadas pelo método do DNS proposto por Miller (1959), sendo que a concentração de açúcares redutores liberados do primeiro ciclo foi definida como máxima hidrólise naquele tempo.

### 2.3. CLARIFICAÇÃO DO SUCO DE UVA

Para a clarificação do suco de uva, as preparações enzimáticas comerciais (Item 2.1.2) e os combi-CLEAs foram diluídos e padronizados pela atividade de pectinase total, avaliando-se a redução na turbidez (Item 2.4.15.), seguindo os passos abaixo:

- Adição de 5 U de pectinase total em 1 mL de suco de uva;
- Incubação a 40 °C durante 1 h;
- Centrifugação a 5000 × g por 2 min;
- Leitura em espectrofotômetro, a 860 nm, contra um branco preparado com água destilada.

Um tratamento controle (sem enzima) foi submetido ao mesmo procedimento. A porcentagem da redução de turbidez foi medida, considerando a turbidez de 100 % para o tratamento controle.

## 2.4. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

### 2.4.1. Determinação da atividade de pectinase total (PE)

A atividade de pectinase total foi determinada pela liberação de substâncias redutoras pela hidrólise da solução de pectina cítrica (75 % grau de esterificação) que foram quantificadas pelo método de DNS (Miller, 1959). O procedimento analítico foi o seguinte:

- 0,1 mL da preparação enzimática diluída foi adicionado a 0,9 mL de substrato (1 g.L<sup>-1</sup> de pectina) em tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8);
- Incubação a 37 °C durante 1 min, sob agitação;
- 1 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS) foi adicionado a cada tubo de ensaio;
- Incubação a 100 °C por 5 min e, em seguida, resfriados em banho de gelo;
- Leitura em espectrofotômetro, a 540 nm, contra uma amostra controle preparada sem enzima, submetida ao mesmo procedimento.

Os valores de absorbância encontrados em cada amostra foram convertidos em concentração através da curva de calibração construída com soluções de ácido galacturônico (Sigma), entre 0,2 a 1,2 mg.L<sup>-1</sup>. Uma unidade de pectinase total foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de grupos redutores por minuto, nas condições da reação e expressa em unidades/mL (U.mL<sup>-1</sup>). A atividade de pectinase total foi calculada pela Equação 5:

$$U/ml = \frac{C * v_f * f_{dil}}{t * v_e} \quad (5)$$

Onde:

$C$  = concentração de grupos redutores liberados ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

$v_f$  = volume final da reação (mL)

$f_{dil}$  = fator de diluição

$t$  = tempo de reação (min)

$v_e$  = volume de enzima (mL)

#### 2.4.2. Determinação da atividade de poligalacturonase (PG)

A atividade de poligalacturonase foi determinada pela hidrólise de ácido poligalacturônico, liberando ácidos galacturônicos que foram quantificadas pelo método de DNS (Miller, 1959). O procedimento analítico foi o seguinte:

- 0,1 mL da preparação enzimática diluída foi adicionado a 0,9 mL de substrato ( $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido poligalacturônico) em tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8);
- Incubação a 37 °C durante 2 min, sob agitação;
- 1 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS) foi adicionado a cada tubo de ensaio;
- Incubação a 100 °C por 5 min e, em seguida, resfriados em banho de gelo;
- Leitura em espectrofotômetro, a 540 nm, contra uma amostra controle preparada sem enzima, submetida ao mesmo procedimento.

Os valores de absorbância encontrados em cada amostra foram convertidos em concentração de ácido galacturônico através da curva de calibração construída conforme citado anteriormente (Item 2.4.1). Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de ácido galacturônico por minuto, nas condições da reação e expressa em unidades/mL ( $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A atividade de PG foi calculada pela Equação 5.

### 2.4.3. Determinação da atividade de pectina liase (PL)

A atividade de pectina liase foi determinada espectrofotometricamente pela medida do aumento da absorbância em 235 nm devido a formação de produtos insaturados, conforme descrito por Albersheim e Killias (1962), com modificações. O procedimento analítico foi o seguinte:

- 0,05 mL da preparação enzimática diluída foi adicionado a 0,95 mL de substrato (4 g.L<sup>-1</sup> de pectina) em tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8);
- Incubação a 37 °C durante 1 min, sob agitação;
- 3 mL de tampão de parada (HCl 0,5 M) foi adicionado a cada tubo;
- Leitura em espectrofotômetro, a 235 nm, contra uma amostra controle preparada sem enzima, submetida ao mesmo procedimento.

Os valores de absorbância encontrados em cada amostra foram convertidos em concentração utilizando o coeficiente de extinção molar do uronídeo insaturado ( $\epsilon = 5500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), Equação 6. Uma unidade de PL foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 nmol de uronídeo insaturado por min, nas condições da reação e expressa em unidades/mL (U.mL<sup>-1</sup>).

$$U/ml = \frac{Abs * v_f * f_{dil}}{\epsilon_m * L * t * v_e} \quad (6)$$

Onde:

$Abs$  = absorbância das amostras

$v_f$  = volume final da reação (mL)

$f_{dil}$  = fator de diluição

$\epsilon_m$  = coeficiente de extinção molar

$L$  = comprimento que a luz atravessa na amostra (cm)

$t$  = tempo de reação (min)

$v_e$  = volume de enzima (mL)

#### 2.4.4. Determinação da atividade de pectina metil esterase (PME)

A atividade de pectina metil esterase foi determinada por titulação de grupos carboxílicos liberados através da desesterificação da pectina cítrica, de acordo com o método descrito por Rouse e Atkins (1952), com modificações. O procedimento analítico foi o seguinte:

- 0,1 mL da preparação enzimática diluída foi adicionado 9,9 mL de substrato ( $5 \text{ g.L}^{-1}$  de pectina) em NaCl (0,15 M, pH 4,5);
- Incubação a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  por 10 min, sob agitação;
- Titulação com NaOH (0,02 M) até alcançar o pH final de 4,5;

Os valores de NaOH gastos em cada amostra foram convertidos em concentração utilizando a Equação 7. Uma unidade de PME foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 mEq de grupos carboxílicos por mL por minuto, nas condições da reação e expressa em unidades/mL ( $\text{U.mL}^{-1}$ ).

$$U/ml = \frac{mL \text{ NaOH} * M \text{ NaOH} * f_{dil} * 1000}{t * v_e} \quad (7)$$

Onde:

$mL \text{ NaOH}$  = volume gasto de NaOH (mL)

$M \text{ NaOH}$  = molaridade da solução de NaOH

$f_{dil}$  = fator de diluição

$t$  = tempo de reação (min)

$v_e$  = volume de enzima (mL)



#### **2.4.5. Determinação da atividade de celulase total (CE)**

A atividade celulolítica foi determinada utilizando papel filtro Whatman nº1, como substrato, seguindo o método proposto por Ghose (1987), com modificações. O procedimento analítico foi o seguinte:

- 0,5 mL da preparação enzimática diluída foi adicionado a 50 mg de papel filtro em 0,5 mL de tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8);
- Incubação a 50 °C por 5 min, sob agitação;
- 1 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS) foi adicionado a cada tubo de ensaio;
- Incubação a 100 °C por 5 min e, em seguida, resfriados em banho de gelo;
- Leitura em espectrofotômetro, a 540 nm, contra uma amostra controle preparada sem enzima, submetida ao mesmo procedimento.

Os valores de absorbância encontrados em cada amostra foram convertidos em concentração através da curva de calibração de glicose construída conforme descrito anteriormente. Uma unidade de CE foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de grupos redutores por min, nas condições da reação e expressa em unidades/mL ( $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A atividade de celulase total foi calculada pela Equação 5.

#### **2.4.6. Determinação de sólidos solúveis totais (°Brix)**

Sólidos solúveis totais (°Brix) foram medidos usando um refratômetro portátil. O procedimento analítico foi o seguinte:

- Amostras foram ambientadas a  $20,0 \pm 0,5$  °C;
- 3 gotas foram adicionadas ao prisma do refratômetro com auxílio de uma pipeta de

Pasteur;

Leitura do °Brix.

#### 2.4.7. Determinação de açúcares redutores

A quantificação dos açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), proposto por Miller (1959). O procedimento analítico foi o seguinte:

- 1 mL de suco diluído foi adicionado a 1 mL de DNS em tubos de ensaio,
- Incubação a 100 °C por 5 min e, em seguida, resfriados em banho de gelo;
- Leitura em espectrofotômetro, a 540 nm, contra uma amostra controle preparada com água destilada, submetida ao mesmo procedimento.

Os valores de absorvância encontrados em cada amostra foram convertidos em concentração através da curva de calibração construída com soluções de glicose, conforme descrito anteriormente.

#### 2.4.8. Determinação da acidez total

Acidez total foi realizada através do método titulométrico. O procedimento analítico foi o seguinte:

- 10 mL da amostra foi adicionando a 100 mL de água destilada;
- Titulação com NaOH (0,1 M) até o pH 8,2, sob agitação.

Os valores de NaOH gastos em cada amostra foram convertidos em gramas por litro de ácido tartárico, utilizando a Equação 8.

$$At = \frac{n * M * 1000 * 0,075}{V} \quad (8)$$

Onde:

$At$  = acidez total (g.L<sup>-1</sup> de ácido tartárico)

$n$  = volume gasto de NaOH (mL)

$M$  = molaridade da solução de NaOH (mol.L<sup>-1</sup>)

$V$  = volume de amostra (mL)

#### 2.4.9. Determinação do pH

O pH do suco foi determinado utilizando um medidor de pH digital com controlador de temperatura, calibrado com soluções tampão a pH 7,0 e pH 4,0.

#### 2.4.10. Determinação da cor

A determinação da cor do suco foi realizada através de um Colorímetro Minolta (modelo CR-400, Minolta Sensing Konica, Inc., Osaka, Japão), segundo Tiwari et al. (2010), com base em três coordenadas,  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , que significam respectivamente luminosidade, que varia de 0 a 100 (preto/branco); intensidade de vermelho/verde (+/-) e intensidade de amarelo/azul (+/-). Antes da medição das coordenadas, as amostras de suco foram homogeneizadas e adicionadas com auxílio de uma pipeta de Pasteur na cubeta que foi acoplada ao colorímetro.

Além das coordenadas, foi calculado o ângulo de tonalidade ( $h^*$ ), o croma ( $C^*$ ) e diferença de cor ( $\Delta E^*_{ab}$ ), através das Equações 9, 10, e 11, respectivamente:

$$h^* = \text{atan}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (9)$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (10)$$

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (11)$$

#### 2.4.11. Determinação de compostos fenólicos por HPLC-DAD-MS

Os compostos fenólicos foram determinados de acordo com o protocolo descrito por Rodrigues et al. (2013). As análises cromatográficas foram realizadas usando um HPLC Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com duas bombas, desgaseificador, forno da coluna, ligado em série a um detector de arranjo de diodo e um espectrômetro de massas com

analisador Q-TOF e fonte de ionização por *electrospray* (ESI) (Bruker Daltonics, modelo micrOTOF-QII, Bremen, Alemanha).

Primeiramente, antes das injeções no HPLC, houve a preparação das amostras de suco de uva, seguindo os passos:

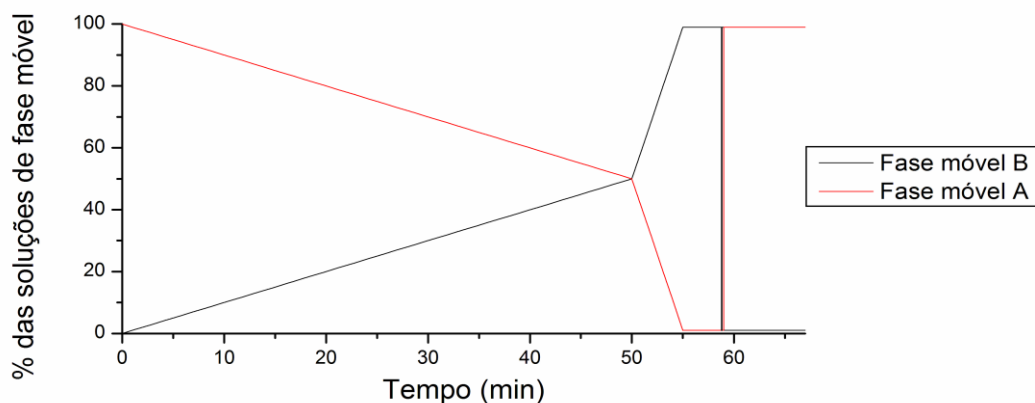
- Centrifugação a  $15000 \times g$  por 10 min a 4 °C;
- Filtração com membranas de 0,22  $\mu\text{m}$  de acetato de celulose (Millipore®, Massachusetts, EUA);
- Injeção de 20  $\mu\text{L}$  ao sistema cromatográfico.

O compostos fenólicos foram separados em coluna Atlantis C18 RP-T3 (5  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4,6 mm) e coluna Synergi Hydro-RP C18 (4  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4,6 mm, Phenomenex), a um fluxo de 0,7 mL.min<sup>-1</sup> e temperatura da coluna de 29 °C, usando duas soluções de fase móvel:

- Fase móvel A: solução de água ultrapura (Milli-Q®, Millipore®) acidificada com ácido fórmico (99,5:0,5 v/v);
- Fase móvel B: solução de acetonitrila acidificada com ácido fórmico (99,5:0,5 v/v).

Um gradiente linear para as soluções de fase móvel foi utilizado (Fig. 2), iniciando com a proporção de 99:1 para A/B, aumentando linearmente a proporção da fase móvel B até alcançar 50:50 (A/B) em 50 min. Na sequência, foi aumentado novamente a proporção de B até 1:99 (A/B) em 5 min. Essa relação anterior (1:99) foi mantida por mais 5 minutos e após esse tempo o sistema voltou a condição inicial de 99:1 para A/B.

Figura 1. Gradiente linear das soluções de fase móvel.



Os espectros de UV-vis foram obtidos entre 200 e 800 nm e os cromatogramas foram processados a 280, 320, 360, e 520 nm.

O eluato da coluna foi dividido para permitir a entrada de apenas  $0,35 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  na interface de ESI do espectrômetro de massas. Os espectros de massas foram adquiridos com uma faixa de varredura de 100 a 700  $m/z$ . Os parâmetros de MS foram os seguintes: fonte ESI nos modos de ionização positivo e negativo; voltagem do capilar: 2000 V (positivo) ou -3000 V (negativo); *end plate offset*: -500 V; gás de secagem:  $\text{N}_2$ ; temperatura: 310 °C; vazão de nitrogênio:  $8 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ; gás nebulizador: 2 bar. A fragmentação ( $\text{MS}^2$ ) foi obtida no modo automático, aplicando uma energia de fragmentação de 34 eV. Os compostos fenólicos foram identificados com base nas seguintes informações: ordem de eluição e tempo de retenção na coluna de fase reversa, UV-vis e características dos espectros de massas ( $\text{MS}$  e  $\text{MS}^2$ ) comparados com padrões analisados nas mesmas condições e com dados disponíveis na literatura.

Os compostos fenólicos foram quantificados pelas áreas dos picos encontrados nos cromatogramas do HPLC-DAD, usando curvas analíticas (Tabela 5) com nove pontos dos seguintes compostos:

Tabela 5. Validação das curvas analíticas pelo HPLC-DAD.

Compostos	R <sup>2</sup>	LD <sup>a</sup>	LQ <sup>b</sup>
Ácido gálico	0,9997	1,0	3,0
Ácido cafeico	0,9999	0,4	1,3
Ácido cumárico	0,9989	1,0	3,0
Ácido ferúlico	0,9999	0,2	0,7
Quercetina	0,9966	4,4	13,3
Cianidina	0,9993	0,3	1,0

<sup>a</sup>Limite de detecção (mg.L<sup>-1</sup>); <sup>b</sup>Limite de quantificação (mg.L<sup>-1</sup>).

#### 2.4.12. Determinação da capacidade redutora

A capacidade redutora foi determinada através do método de Folin-Ciocalteu proposto por Singleton e Rossi (1965), com modificações. O procedimento analítico foi o seguinte:

- 20 µl de amostra de suco diluído foi misturado a 1,68 ml de reagente de Folin-Ciocalteu 2 M em tubos de ensaio protegidos da luz;
- 300 µl de tampão carbonato de sódio foi adicionado aos tubos e devidamente homogeneizados;
- Incubação a 2 h no escuro;
- Leitura em espectrofotômetro, a 765 nm, contra uma amostra controle preparada com 10 % de etanol, submetida ao mesmo procedimento.

Os valores de absorbância encontrados em cada amostra foram convertidos em concentração utilizando uma curva de calibração construída com soluções de ácido gálico entre 0,1 a 0,4 mg.L<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (mg) por litro de suco.

#### 2.4.13. Determinação da capacidade antioxidante pelo método do ABTS

O ensaio de ABTS foi realizado como descrito por Re et al, (1999). O procedimento analítico foi o seguinte:

- A solução estoque de ABTS 7 mM foi misturado com persulfato de potássio 2,45 mM para a produção da solução de radical ABTS;
- Incubação a 16 h no escuro à temperatura ambiente ( $\pm 20$  °C), antes da utilização;
- Diluição com etanol/água (50:50, v/v) da solução de radical ABTS até alcançar uma absorbância de 0,70 ( $\pm 0,02$ ) a 750 nm;
- Diluição das amostras de suco para produzir uma inibição da solução de radical ABTS entre 20 % e 80 % da absorbância inicial;
- 0,3 mL do suco diluído foi adicionado a 2,7 mL da solução de radical ABTS;
- Leitura em espectrofotômetro no tempo de 0 min (absorbância inicial) e no tempo de 6 min (absorbância final), a 750 nm, contra uma amostra controle preparada com água destilada, submetida ao mesmo procedimento.

Através da diferença entre as absorbâncias inicial e final foi obtido a % de inibição do radical ABTS. Os valores de inibição encontrados em cada amostra foram convertidos em concentração utilizando uma curva de calibração construída com soluções de Trolox (ácido-6-hydroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (Sigma), entre 5 a 50 mM. Os resultados foram expressos como equivalentes de Trolox (mM) por litro de suco de uva.

#### **2.4.14. Quantificação de proteínas**

O método de Bradford é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de "Coomassie brilliant blue" BG-250. O procedimento analítico foi o seguinte:

- 20  $\mu$ L de amostra foi adicionado a 1 mL de reagente de Bradford;
- Estabilização da cor por 5 min;
- Leitura em espectrofotômetro, a 595 nm, contra uma amostra controle preparada com água destilada, submetida ao mesmo procedimento.

Os valores de absorvância encontrados em cada amostra foram convertidos em concentração utilizando uma curva de calibração construída com soluções de BSA (padrão de proteína, albumina do soro bovino), entre 0,1 a 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos em mg.mL<sup>-1</sup> de albumina.

#### **2.4.15. Determinação da turbidez**

Turbidez dos sucos foi medida através da luz dispersa por espectrofotometria, como proposto por Anderson (2005) com modificações, seguindo as etapas:

- Centrifugação das amostras a 5000 × g por 2 min;
- Leitura da absorvância a 860 nm;

Através da diferença entre as absorvâncias do controle e das amostras tratadas foi obtido a % de redução da turbidez.



**CAPÍTULO 3 - Identification of bioactive compounds from *Vitis labrusca* L. variety  
Concord grape juice treated with commercial enzymes: improved yield and quality  
parameters**

Neste trabalho foi avaliado o efeito da composição de oito diferentes preparados enzimáticos sobre os parâmetros de qualidade como cor, sólidos solúveis totais (°Brix), açúcares redutores, acidez total, pH e capacidade antioxidante. Os compostos fenólicos e antocianinas foram identificados e quantificados por HPLC-DAD-MS. Os resultados estão apresentados no manuscrito a seguir, publicado na revista *Food and Bioprocess Technology*, v. 9, p. 365-377, 2016.

**Identification of bioactive compounds from *Vitis labrusca* L. variety Concord grape juice treated with commercial enzymes: improved yield and quality parameters**

Lucas Dal Magro<sup>a</sup>, Daniela Goetze<sup>a</sup>, Camila Tiefensee Ribeiro<sup>a</sup>, Natalia Paludo<sup>a</sup>, Eliseu Rodrigues<sup>b</sup>, Plinho Francisco Hertz<sup>a</sup>, Manuela Poletto Klein<sup>a,c</sup>, Rafael C. Rodrigues<sup>a,\*</sup>

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

<sup>b</sup>Laboratory of Natural Antioxidants, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>c</sup>Department of Bioprocesses, State University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

\* Corresponding author:

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

E-mail address: rafaelfrodrigues@ufrgs.br (R. C. Rodrigues) - [www.ufrgs.br/bbb](http://www.ufrgs.br/bbb)

## Abstract

In this work, the effects of eight different enzymatic preparations were compared in terms of the extraction of bioactive compounds as well as the yield and quality of grape juice from *Vitis labrusca* L. variety Concord. Juices were prepared by enzymatic treatment and the used preparations were characterized through five enzymatic activities: total pectinase (PE), polygalacturonase (PG), pectinlyase (PL), pectin methyl esterase (PME) and cellulase (CE). Quality parameters such as color, total soluble solids (°Brix), reducing sugars, titratable acidity, pH and antioxidant capacity were determined for all samples. Phenolic compounds and anthocyanins were identified and quantified by HPLC-DAD-MS. Juice yield was improved by preparations with high activities of PG, PME and PL, up to 9 % higher than the control, when used Pectinex® Ultra Clear. For the extraction of bioactive compounds, the highest values were found for preparations with high CE activity. Regarding the phenolic compounds, fifteen compounds were identified. The content of caftaric acid and total anthocyanins were improved up to 300 and 60 %, respectively, using Lallzyme® Beta. It was possible to understand the role of each enzyme in the extraction of yield, quality parameters and bioactive compounds. Pectinex® Ultra Clear was the preparation that provided the highest yield and Lallzyme® Beta the highest bioactive compounds concentration. For a good quality juice and high yields for the industry, it is important a good balance of pectinases and cellulases.

Keywords: pectinase; cellulase; grape juice extraction; bioactive compounds; antioxidant activity; HPLC-DAD-MS.

## 1. Introduction

The increased demand for natural products that provide nutritional benefits for consumer health, promotes the research and development of products derived from the grape. It has been recognized that there is an inverse association between the consumption of some fruits and vegetables and mortality from age-related diseases, which could be partly attributed to the presence of antioxidant compounds (Dudonné et al. 2009).

In this sense, grapes and their products are rich in antioxidant compounds such as flavonoids, anthocyanins, tannins, phenolic acids, among others (Abe et al. 2007; Capanoglu et al. 2013). Among these derivatives, it can be highlighted the grape juice, because it is a product that can be included in the diet of all people, from children to elderly, where the wine is not indicated. Grape juices are rich in bioactive compounds that can reduce the damage caused by oxidative stress, helping to the prevention of many diseases such as cancer, atherosclerosis, diabetes, cardiovascular and neurological diseases (Castilla et al. 2006; Dani et al. 2007; Cantos et al. 2002; Lacerda et al. 2014).

In the production of grape juice, the addition of enzymes during the maceration prior to pressing is a prerequisite for obtaining satisfactory juice yield. In addition, the enzyme-catalyzed degradation of cell walls helps to release bioactive compounds, thus enhancing the recovery of phenols and anthocyanins, which otherwise would be lost in press residues (Sowbhagya and Chitra 2010).

Commercial enzymes used in juice extraction consist of a complex of pectinolytic and cellulolytic enzymes that act in different ways catalyzing the hydrolysis of pectic and cellulosic substances in fruits. Pectinolytic complex is formed mainly by polygalacturonase, pectin methyl esterase and pectinlyase, while cellulolytic complex is composed by endo and exo-cellulase and  $\beta$ -glucosidase (Sankaran et al. 2015). Moreover, in the fruit juice industry, these enzymes are used to improve the sensorial quality, providing clearer juices, helping in

filtration processes, clarification and stabilization of the products, and promoting greater extraction of compounds responsible for the color (Pinelo et al. 2010; Khandare et al. 2011; Sandri et al. 2011; Romero-Cascales et al. 2012).

Actually, there is a great number of commercial pectinases and cellulases able to the application on the fruit juice industry, and it is important to know the enzymatic composition and the ability of each preparation for extraction of specific compounds and yield, for a correct use in juice industry (Kashyap et al. 2001; Tapre and Jain 2014). Thus, the objective of this work was to evaluate and compare the effects of eight different commercial enzyme preparations in the extraction of bioactive compounds and yield of grape juice. Different from other works that generally make a superficial comparison of enzymatic preparations, excluding the composition of each one (Lima et al. 2015; Toaldo et al. 2014; Mojsov et al. 2011; Mojsov et al. 2010), we compared five enzymatic activities in each preparation, verifying their synergistic effects and proposing the better application for each preparation. After the enzymatic treatment, juices were evaluated to yield, color, total soluble solids (°Brix), reducing sugars, titratable acidity, and pH, as well as phenolic compounds concentration, anthocyanins, and antioxidant activity. Additionally, phenolic compounds and anthocyanins were quantified and identified by High Performance Liquid Chromatograph with Diode Array Detector and Mass Spectrometry (HPLC-DAD-MS).

## **2. Material and methods**

### **2.1. Material**

Grapes from the Concord variety were kindly donated by Vitivinícola Jolimont (Canela, RS, Brazil) and were hygienized with NaClO solution (1 %) for 15 min and washed with potable water, before stored at -18 °C until processing. Pectinex® Ultra SP-L, Pectinex® Ultra Color, Pectinex® Smash XXL, Novozym® 33095, Pectinex® Ultra Clear, Pectinex®

BE XXL were kindly donated by Novozymes (Spain), Rohapect® 10L was from Amazon group (Brazil) and Lallzyme® Beta was from Lallemand Wine (France).

Pectin from apple (ID 76282), polygalacturonic acid, galacturonic acid, gallic acid, caffeic acid, quercetin, ferulic acid, coumaric acid, cyanidin, trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) and Folin-Ciocalteu were from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Formic acid, acetonitrile and methanol HPLC grade were from Panreac Quimica SL (Barcelona, Spain). All solvents and other chemicals were of analytical or HPLC grade. The samples and solvents were filtered through Millipore® membranes of 0.22 and 0.45  $\mu\text{m}$ , respectively.

## **2.2. Methods**

Experiments were performed in triplicates, and the results are expressed as the mean standard deviation (SD) of these experiments.

### **2.2.1. Enzymatic activities**

Total pectinase (PE) and polygalacturonase (PG) activities were determined using pectin and polygalacturonic acid as substrates ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ), respectively. Briefly, 0.1 mL of properly diluted enzyme was added to 0.9 mL of substrate, prepared in sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.8), and incubated at 37 °C, for 1 min for PE activity and 2 min for PG activity, under agitation. The amount of reducing groups was estimated by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method according to Miller (1959). One unit of PE and PG activity was defined as the amount of enzyme required to release 1  $\mu\text{mol}$  of reducing groups, expressed as glucose, per min under the reaction conditions.

Pectinlyase (PL) activity was estimated spectrophotometrically measuring the increase in absorbance at 235 nm, by the formation of unsaturated products, as described by

Albershein (1966), with slight modifications. Briefly, 0.05 mL of the diluted enzyme was added to 0.95 mL of pectin solution ( $4 \text{ g.L}^{-1}$ ) prepared in sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.8) and incubated at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  for 1 min, under agitation. The reaction was stopped by adding 3 mL of 0.5 M HCl. One PL unit was defined as the amount of enzyme that produces 1 nmol of unsaturated uronide ( $\epsilon = 5500 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  at 235 nm) per min, under the reaction conditions.

Pectin methyl esterase (PME) activity was determined by titration of carboxylic groups released through the de-esterification of pectin, as described by Rouse and Atkins (1952), with slight modifications. Briefly, 0.1 ml of the diluted enzyme was added to 9.9 mL of pectin solution ( $5 \text{ g.L}^{-1}$ ) prepared in NaCl buffer (0.15 M, pH 4.5). The reaction was conducted at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  for 10 min, under agitation. One PME unit was defined as the amount of enzyme which liberates 1 milliequivalent of carboxyl groups per minute under the reaction conditions cited above.

Total cellulase (CE) activity was determined using Whatman n°1 filter paper as substrate, following the method proposed by Ghose (1987), with slight modifications. The enzyme preparation previously diluted (0.5 mL) was added to 0.5 mL of sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.8) containing 50 mg of filter paper. The reaction was carried out at  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  for 5 min, under agitation. The released reducing sugars were estimated by the DNS method according to Miller (1959). One CE unit was defined as the amount of enzyme required to release  $1 \text{ } \mu\text{mol}$  of reducing groups, expressed as glucose, per min under the reaction conditions.

### **2.2.2. Extraction of grape juice**

For the juices extraction, 100 g of grape berries were gently crushed by hand with a pestle. Afterwards, 1 mL of the enzyme preparation, diluted and standardized based on its pectinase activity, was mixed with the crushed grapes and allowed to react for 30 min at 50

°C, under agitation. At the end, the juice was pressed, analyzed and stored at -18 °C. For all experiments, a control was performed without enzyme. Grape juice yield (JY) was calculated according to the equation 1:

$$JY (\%) = \frac{\text{mass of juice}}{\text{initial mass of grapes}} \times 100 \quad (1)$$

### 2.2.3. Total soluble solids (°Brix), reducing sugars, total acidity and pH

Soluble solids (°Brix) were measured using a refractometer at  $20.0 \pm 0.5$  °C. The reducing sugars were quantified by the DNS method, proposed by Miller (1959). For total acidity, the diluted juice was titrated with a 0.1 M NaOH, using phenolphthalein as indicator. It was expressed in  $\text{g.L}^{-1}$  of tartaric acid. The pH of the juice was measured using a digital pHmeter.

### 2.2.4. Color determination

Determination of juice color was performed in a Minolta Colorimeter (Model CR-400, Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japan), according to Tiwari et al. (2010). It was based on 3 color coordinates:  $L^*$  (whiteness or brightness/darkness),  $a^*$  (redness/greenness) and  $b^*$  (yellowness/ blueness). The hue angle ( $h^*$ ), Chroma ( $C^*$ ) and Color difference ( $\Delta E^*_{ab}$ ) were calculated following the equations 2, 3 and 4, respectively:

$$h^* = \text{atan} \left( \frac{b^*}{a^*} \right) \quad (2)$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (3)$$

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (4)$$

### 2.2.5. HPLC-DAD-MS analysis of phenolic compounds

Phenolic compounds were determined according to a protocol described by Rodrigues



et al. (2013). Chromatographic analyses were performed using a Shimadzu HPLC (Kyoto, Japan) equipped with two pumps, on-line degasser, column oven, connected in series to a diode array detector and a mass spectrometer with an Q-TOF analyzer and electrospray ionization (ESI) source (Bruker Daltonics, model micrOTOF-QIII, Bremen, Germany).

Previously to the HPLC analysis, grape juice samples were centrifuged and filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  cellulose acetate membrane filter (Millipore®, Massachusetts, USA) and 20  $\mu\text{L}$  were directly injected into the chromatographic system. The phenolic compounds were separated in a  $\text{C}_{18}$  Atlantis T3-RP column (5  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4.6 mm, Dublin, Ireland) at a flow rate of 0.7  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , column temperature at 29  $^{\circ}\text{C}$ , using a mobile phase consisting of water/formic acid (99.5:0.5, v:v) (solvent A) and acetonitrile/formic acid (99.5:0.5, v:v) (solvent B) in a linear gradient from A:B 99:1 to 50:50 in 50 min; then from 50:50 to 1:99 in 5 min. The former ratio (1:99) was maintained for additional 5 min. The column eluate was split to allow only around 0.35  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  entering the ESI interface. The UV-vis spectra were obtained between 200 and 800 nm and the chromatograms were processed at 280, 320, 360 and 520 nm.

The mass spectra were acquired with a scan range from  $m/z$  100 to 700. The MS parameters were set as follows: ESI source in positive and negative ion modes; capillary voltage, 2000 V (positive) or  $-3000$  V (negative); end plate offset,  $-500$  V; dry gas ( $\text{N}_2$ ) temperature, 310  $^{\circ}\text{C}$ ; flow rate, 8  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ; nebulizer gas, 2 bar.  $\text{MS}^2$  were set in automatic mode applying a fragmentation energy of 34 V. The phenolic compounds were identified on the basis of the following information: elution order and retention time in the reversed phase column, UV-Vis and MS spectra features compared to standards analyzed under the same conditions, and data available in the literature.

The phenolic compounds were quantified by HPLC-DAD, using analytical curves ( $r^2 > 0.99$ ) with nine-point of the following compounds, with their respective detection and

quantification limits (in  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ): caffeic acid (0.4 and 1.3); coumaric acid (1.0 and 3.0); ferulic acid (0.3 and 1.0); quercetin (4.4 and 13.3); and cyaniding (0.3 and 1.0).

### **2.2.6. Antioxidant capacity**

Antioxidant capacity was estimated using two *in vitro* assays, ABTS and reducing capacity.

ABTS assay was performed as described by Re et al. (1999). Briefly, ABTS radical was produced by reacting 7 mM ABTS stock solution with 2.45 mM potassium persulphate and allowing the mixture to stand in a dark room at room temperature (20 °C) for 16 h before use. The ABTS radical solution was diluted with ethanol:water (50:50, v:v) mixture to an absorbance of 0.70 ( $\pm$  0.02) at 750 nm. The grape juice was diluted to produce between 20–80 % inhibition of the initial ABTS absorbance. An aliquot of 300  $\mu\text{L}$  of the sample was added to 2.7 mL of ABTS radical solution and the decrease of absorbance at 750 nm was recorded during 6 min in a spectrophotometer. Trolox was used as standard for the calibration curves and results were expressed as equivalents of Trolox (mmol) per liter of grape juice.

The reducing capacity was determined by the Folin-Ciocalteu method proposed by Singleton and Rossi (1969), with slight modifications. A mixture of 20  $\mu\text{L}$  of grape juice, 1.68 mL of Folin-Ciocalteu reagent and 300  $\mu\text{L}$  of sodium carbonate buffer were placed in assay tubes. After 2 h of reaction in the dark, the absorbance was measured at 765 nm. The results were expressed as equivalents of gallic acid (mg) per liter of grape juice.

## **3. Results and discussion**

### **3.1. Enzymatic activity of commercial preparations**

Initially, eight commercial preparations were analyzed regarding five enzymatic activities (PE, PG, PL, PME and CE) and the results are shown in **Table 1**. All commercial

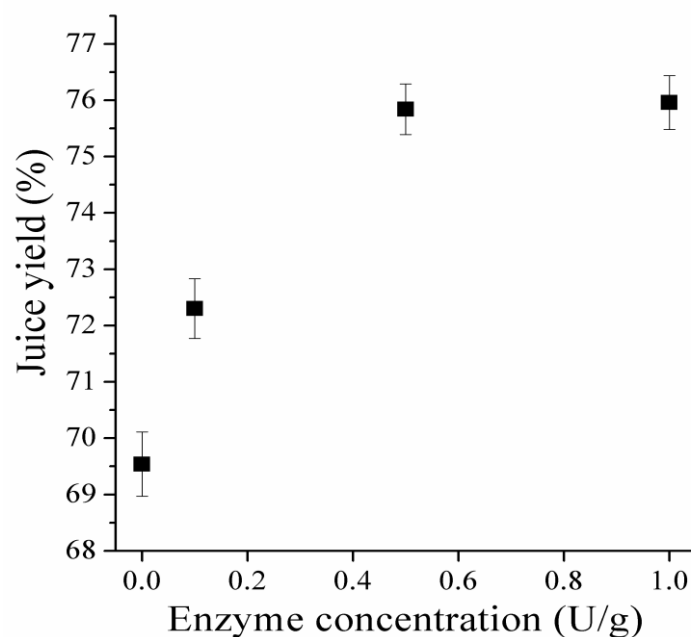
enzymes are pectinases indicated for use in juice production and wines to produce better product quality, reducing the viscosity, increasing the juice extraction and improving the pressing and clarification processes. Pectinex® Ultra SP-L, Pectinex® Ultra Color, Pectinex® Ultra Clear are commercialized by Novozymes as pectinolytic preparations, with declared activity of polygalacturonase, while Pectinex® Smash XXL has declared activity of pectinlyase. Among these enzymatic preparations, Lallzyme® Beta can be highlighted due to its high  $\beta$ -glucosidase secondary activity, and it was specially developed to enhance the aromatic profile of wine, since this enzyme is able to hydrolyze the glycosylated aroma compounds (as monoterpenes, norisoprenoids, benzene derivatives) (Villena et al. 2007). Other enzymes have not a specific activity declared. Despite this, it can be observed in **Table 1** that all preparations are a mixture of different enzymes, and their exact activities are an important information to make the right choice for the industry. Therefore, in the next experiments we evaluated these preparations for the grape juice extraction, analyzing the yield, quality parameters and bioactive compounds, aiming to understand the contribution of each enzyme at each result and thus, to define the best preparation.

Table 1. Total pectinase activity (PE), polygalacturonase (PG), pectinlyase (PL), pectin methylesterase (PME) and cellulase (CE) in commercial enzyme preparations.

<i>Enzyme preparation</i>	<i>Enzyme Activity</i>				
	<b>PE</b> (U.mL <sup>-1</sup> )	<b>PG</b> (U.mL <sup>-1</sup> )	<b>PL</b> (U.mL <sup>-1</sup> )	<b>PME</b> (U.mL <sup>-1</sup> )	<b>CE</b> (U.mL <sup>-1</sup> )
1 – Pectinex Ultra SP-L	3850.28	8887.45	35.80	315.56	32.24
2 – Pectinex Ultra Color	8314.50	9839.95	848.16	3140.00	55.77
3 – Pectinex Smash XXL	9011.76	0.00	2358.66	0.00	23.90
4 – Novozym 33095	6687.56	7910.21	757.67	3217.78	63.32
5 – Pectinex Ultra Clear	7875.97	9090.32	792.57	4254.44	72.40
6 – Pectinex BE XXL	7454.99	2991.84	1340.76	1545.56	30.17
7 – Rohapect 10L	4284.42	6920.60	470.63	1857.78	89.16
8 – Lallzyme Beta	4226.32	3912.18	186.18	0.00	1134.36

In order to determine the best amount of enzyme (based on total pectinase activity) for the application on grape juice extraction, we selected Pectinex® Ultra Clear and varied its concentration per gram of grape: 0.1 U, 0.5 U and 1.0 U. This preparation was chosen because it exhibited a good balance for all enzymatic activities analyzed. The yield of extracted juice was evaluated and expressed, for each concentration in **Fig. 1**. The highest juice yield was achieved using 1.0 U.g<sup>-1</sup>. However, there is no statistical difference between 1.0 and 0.5 U.g<sup>-1</sup>. Therefore, the concentration of 0.5 U.g<sup>-1</sup> of PE was chosen as standard for the next experiments.

Figure 1. Juice yield after treatment with Pectinex® Ultra Clear using different enzyme concentrations.



### 3.2. Yield of grape juice extraction

*Vitis labrusca* L. variety Concord is the grape cultivar most widely used for juice production, due to its quality, which provides a highly aromatic juice with good nutritional properties (Morris and Striegler 1996; Rowe et al. 2010). The eight commercial enzyme preparations were tested in the Concord juice extraction, and their activities were based 0.5

U.g<sup>-1</sup> of total pectinase activity. The final activities for each preparation applied for juice extraction are shown in the **Table 2**. The results of grape juice yield for the eight preparations and the control are presented in **Fig. 2**. It was observed that juice yields ranged from 69 % to 75 %. The highest yield was obtained by the treatments with enzymes 2 to 6, where there are no statistical differences at 5 % of significance. When comparing enzyme 5 (Pectinex® Ultra Clear) with the control, 8.7 % increase in the amount of extracted juice was observed.

Table 2. Concentrations of enzyme activity applied for grape juice extractions.

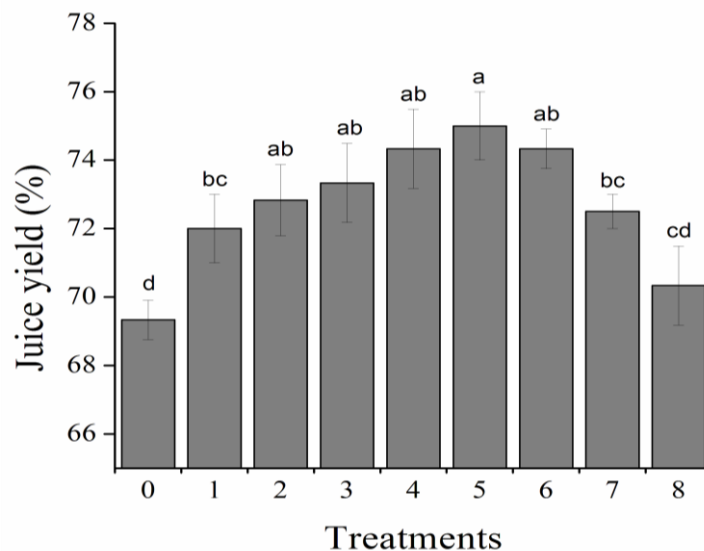
<i>Enzyme preparation</i>	<i>Enzyme Activity</i>				
	<b>PE</b> (U.mL <sup>-1</sup> )	<b>PG</b> (U.mL <sup>-1</sup> )	<b>PL</b> (U.mL <sup>-1</sup> ) x10 <sup>2</sup>	<b>PME</b> (U.mL <sup>-1</sup> )	<b>CE</b> (U.mL <sup>-1</sup> ) x10 <sup>2</sup>
1 – Pectinex Ultra SP-L	0.50	1.15	0.46	0.04	0.42
2 – Pectinex Ultra Color	0.50	0.59	5.10	0.20	0.36
3 – Pectinex Smash XXL	0.50	0.00	13.08	0.00	0.13
4 – Novozym 33095	0.50	0.59	5.66	0.24	0.47
5 – Pectinex Ultra Clear	0.50	0.58	5.03	0.27	0.46
6 – Pectinex BE XXL	0.50	0.20	8.99	0.10	0.20
7 – Rohapect 10L	0.50	0.81	5.49	0.22	1.04
8 – Lallzyme Beta	0.50	0.46	2.20	0.00	13.42

These results can be explained by the good activities of the enzymes of the pectinolytic complex (PG, PME and PL) of these preparations. PME catalyzes the de-esterification of the methoxyl group of pectin, being essential for the action of other enzymes such as PG that catalyzes the hydrolysis of  $\alpha$ -1,4 linkages, which acts on low methoxyl pectin (Alkorta et al. 1998; Jayani et al. 2005). Therefore, the low values of PME presented by enzymes 1 (Pectinex® Ultra SP-L) and 8 (Lallzyme® Beta) were not enough to de-esterify the pectin, impeding its hydrolysis by PG. Besides, the lower yields showed by these preparations (1 and 8) can be also explained by the low PL content. Pectinlyases are responsible for catalyzing the  $\beta$ -elimination, of the main chain of the pectic polysaccharide, acting on pectin with high degree of methylation (Kashyap et al. 2001; Tapre and Jain 2014),

without the need of other enzymes with de-esterification activity. This fact explains the high extraction yields presented by enzymes 3 and 6, which have low values of PG and PME activities, but present high PL concentration. For example, considering the same PE activity, the enzyme 6 (Pectinex® BE XXL) has almost 2-times more PL activity than enzyme 5 (Pectinex® Ultra Clear), while enzyme 5 has almost 3-times more PG and PME activities than enzyme 6. Although very distinct in their compositions, both preparations presented similar results for juice yields.

Overall, these results agreed with the conclusions of other studies suggesting that pectinolytic enzymes could improve the yield of fruit juices. Lieu and Le (2010) also achieved an increase in the yield of approximately 9.2 % in grape juices treated with enzymes. The same behavior was observed when these enzymes were applied in pineapple juice (Chenchin et al. 1984), carrot juice (Demir et al. 2001), and elderberry juice (Landbo et al. 2007). According to Buchert et al. (2005) and Romero-Cascales et al. (2012), pectinases are known to hydrolyze complex polysaccharides of plant tissues into simpler molecules, causing solubilization of these polysaccharides improving the extraction and the yield of juice.

Figure 2. Juice extraction yields using eight different commercial enzyme preparations. Means followed by the same letters do not differ by Tukey's test at 5% probability.



### 3.3. Grape juice characterization

For characterization of grape juice, the parameters pH, total acidity, soluble solids and reducing sugars were evaluated and the results for the each treatment are presented in **Table 3**. It was observed a tendency to pH decrease and acidity increase in the juices treated with enzymes. However, only the enzymes 4 and 5 are statistically different from the control treatment. This can be explained by the good balance in the pectinases activities in these preparations, considering the PE, PG, PL and PME activities.

Table 3. Analysis of pH, total acidity, °Brix and reducing sugars of the juices prepared with eight different commercial enzyme preparations.

<i>Enzyme preparation</i>	<b>Analysis</b>			
	<b>pH</b>	<b>Total acidity (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>°Brix</b>	<b>Reducing sugars (g.L<sup>-1</sup>)</b>
0 - Control	3.17±0.01 <sup>a*</sup>	10.93±0.23 <sup>b</sup>	14.73±0.06 <sup>b</sup>	185.26±1.74 <sup>c</sup>
1 – Pectinex Ultra SP-L	3.13±0.03 <sup>ab</sup>	11.36±0.37 <sup>ab</sup>	14.97±0.21 <sup>ab</sup>	188.43±2.28 <sup>bc</sup>
2 – Pectinex Ultra Color	3.13±0.01 <sup>ab</sup>	11.37±0.43 <sup>ab</sup>	14.90±0.10 <sup>ab</sup>	193.24±3.46 <sup>bc</sup>
3 – Pectinex Smash XXL	3.14±0.01 <sup>ab</sup>	11.26±0.26 <sup>ab</sup>	14.87±0.21 <sup>ab</sup>	193.48±2.30 <sup>abc</sup>
4 – Novozym 33095	3.11±0.01 <sup>b</sup>	11.61±0.38 <sup>a</sup>	15.03±0.06 <sup>ab</sup>	190.38±2.16 <sup>bc</sup>
5 – Pectinex Ultra Clear	3.10±0.02 <sup>b</sup>	11.71±0.25 <sup>a</sup>	14.90±0.20 <sup>ab</sup>	194.48±3.15 <sup>abc</sup>
6 – Pectinex BE XXL	3.13±0.03 <sup>ab</sup>	11.36±0.15 <sup>ab</sup>	14.90±0.10 <sup>ab</sup>	191.15±5.88 <sup>bc</sup>
7 – Rohapect 10L	3.13±0.02 <sup>ab</sup>	11.29±0.25 <sup>ab</sup>	15.10±0.10 <sup>ab</sup>	197.12±4.30 <sup>ab</sup>
8 – Lallzyme Beta	3.14±0.02 <sup>ab</sup>	11.44±0.31 <sup>ab</sup>	15.23±0.12 <sup>a</sup>	202.67±1.30 <sup>a</sup>

\*Means followed by the same letters in the same columns do not differ by Tukey's test at 5% probability

Regarding the reducing sugars content and °Brix, the highest values were obtained for the enzyme 8 (Lallzyme® Beta), while the lowest values were obtained for the control. The high concentration of cellulase activity in enzyme 8 can explain this result. Cellulases are highly specific biocatalysts that work in synergy to release sugars, and they are often found together with pectinases in commercial enzymes preparations. These enzymes can be classified according to the attack position on the substrate as endoglucanases that catalyze the hydrolysis of internal linkages β-1,4 of the cellulose, exoglucanases which act on the ends of the cellulose chain releasing glucose or cellobiose units, and β-glycosidases which hydrolyze

cellobiose, releasing glucose units (Arantes and Saddler 2010), increasing the content of soluble solids and sugars in the juice.

The effect of the different commercial enzyme preparations was also analyzed on the change in color parameters of the grape juice (**Table 4**). For juices treated with all enzymes, it was observed a tendency to increase of the juice color. The highest value of  $a^*$  (redness) was obtained by enzyme 8 (Lallzyme® Beta), and there are no statistical differences with the enzymes 1, 4, 6 and 7. The parameter  $b^*$  (blueness) slightly increased with the addition of enzymes. The overall increase of these two variables leads to a greater chroma ( $C^*$ ), mainly for the enzyme 8. The  $\Delta E^*_{ab}$  was measured to determine the color total difference of the juices in comparison with the control, where can be highlighted the juices produced using the enzymes 6, 7 and 8, which presented the highest values, compared to the control. Regarding the parameters  $L^*$  (brightness) and  $h^*$  (hue), it was not observed significant difference among the treatments. These results can demonstrate the relationship of a good color with the amount of anthocyanins (see results below in section 3.4).

Table 4. Analysis of color of the juices treated with eight different commercial enzyme preparations.

<i>Enzyme preparation</i>	<b>Color parameters</b>					
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*$	$h^*$	$\Delta E^*_{ab}$
0 - Control	31.07±0.44 <sup>a#</sup>	7.28±0.26 <sup>d</sup>	2.51±0.14 <sup>b</sup>	7.70±0.20 <sup>e</sup>	1.23±0.03 <sup>a</sup>	-
1 – Pectinex Ultra SP-L	31.55±0.45 <sup>a</sup>	8.45±0.28 <sup>abc</sup>	2.86±0.21 <sup>ab</sup>	8.93±0.20 <sup>bc</sup>	1.24±0.03 <sup>a</sup>	1.31±0.01 <sup>b</sup>
2 – Pectinex Ultra Color	31.60±0.35 <sup>a</sup>	8.35±0.17 <sup>bc</sup>	3.05±0.08 <sup>a</sup>	8.89±0.13 <sup>cbd</sup>	1.22±0.02 <sup>a</sup>	1.31±0.07 <sup>b</sup>
3 – Pectinex Smash XXL	31.24±0.16 <sup>a</sup>	7.76±0.46 <sup>cd</sup>	2.81±0.22 <sup>ab</sup>	8.26±0.36 <sup>de</sup>	1.22±0.04 <sup>a</sup>	0.65±0.06 <sup>c</sup>
4 – Novozym 33095	31.47±0.22 <sup>a</sup>	8.49±0.21 <sup>abc</sup>	3.02±0.24 <sup>a</sup>	9.02±0.12 <sup>bc</sup>	1.23±0.03 <sup>a</sup>	1.39±0.11 <sup>b</sup>
5 – Pectinex Ultra Clear	31.95±0.27 <sup>a</sup>	8.27±0.48 <sup>bc</sup>	2.84±0.09 <sup>ab</sup>	8.75±0.42 <sup>cd</sup>	1.24±0.03 <sup>a</sup>	1.38±0.05 <sup>b</sup>
6 – Pectinex BE XXL	32.17±0.16 <sup>a</sup>	8.63±0.15 <sup>ab</sup>	3.11±0.07 <sup>a</sup>	9.18±0.11 <sup>abc</sup>	1.23±0.01 <sup>a</sup>	1.85±0.18 <sup>a</sup>
7 – Rohapect 10L	32.14±0.53 <sup>a</sup>	8.93±0.13 <sup>ab</sup>	3.13±0.06 <sup>a</sup>	9.47±0.10 <sup>ab</sup>	1.23±0.01 <sup>a</sup>	2.06±0.02 <sup>a</sup>
8 – Lallzyme Beta	31.80±0.37 <sup>a</sup>	9.17±0.14 <sup>a</sup>	3.14±0.24 <sup>a</sup>	9.70±0.10 <sup>a</sup>	1.24±0.02 <sup>a</sup>	2.12±0.10 <sup>a</sup>

# Means followed by the same letters in the same columns do not differ by Tukey's test at 5% probability;  $L^*$ : lightness;  $a^*$ : redness/greenness;  $b^*$ : yellowness/ blueness;  $C^*$ : chroma;  $h^*$ : hue angle;  $\Delta E^*_{ab}$ : color difference



### 3.4. Phenolic compounds and antioxidant capacity

Besides juice yield and the analysis of quality parameters, it was verified the extraction of bioactive compounds of the grape juice prepared with the eight enzyme preparations and the control.

To better understand the differences between the enzymatic preparations, the identification and quantification of different phenolic compounds was performed by HPLC-DAD-MS. Fifteen phenolic compounds were identified by HPLC-DAD-MS based on the combined information obtained from chromatographic elution on C18 column, UV-Vis and mass spectra characteristics (**Fig. 3** and **Table 5**). The MS<sup>2</sup> fragments characteristic of the chemical structure and functional groups allowed the confirmation of the assigned protonated and deprotonated molecules. **Table 6** shows the concentration of the different phenolic compounds obtained by the different treatments. All treatments showed similar profile of phenolic compounds, although differences regarding the concentration of the compounds.

The total anthocyanins quantified by HPLC varied of 20.50 to 32.57 mg.L<sup>-1</sup>, which are in agreement with the results reported by Lima et al. (2015). The highest content for total anthocyanins was obtained using enzymes 6, 7 and 8, totaling 29.75, 30.36 and 32.57 mg.L<sup>-1</sup>, respectively, representing an increase of 44.4 %, 47.4 % and 58.1 % compared to the control.

Table 5. Chromatographic, UV–Vis, and Mass Spectroscopy Characteristics of phenolic compounds in grape juice, obtained by HPLC–DAD–MS.

Peak <sup>a</sup>	Tr <sup>b</sup> (min)	$\lambda_{\max}$ <sup>c</sup> (nm)	Exact mass	[M+H] <sup>+</sup>	MS <sup>2</sup> (+)	[M-H] <sup>-</sup>	MS2 (-)	Compound
1	17.1	327	617.1162	618.1143	145.0575/264.0223/543.0873	616.1623	149.0241/167.0388/211.0263/ 272.1160/466.1391	2-S-glutathionylcaftaric acid
2	17.5	278/515	611.1612	611.1507	287.0479/449.1036	ND	ND	Cyanidin-3,5-O-diglucoside
3	19.1	322	342.0950	ND <sup>d</sup>	ND	341.1227	133.0433/135.0585/161.0417/ 179.0535/183.0451	Caffeic acid-O-hexoside
4	19.5	278/518	655.1874	655.1782	331.0731/493.1359	ND	ND	Malvidin-3,5-O-diglucoside
5	20.6	320	312.0481	ND	ND	311.0722	135.0601/149.0225/179.0534	Caftaric acid
6	20.8	280/516	449.1084	449.1006	287.0484	447.1375	284.0602	Cyanidin-3-O-glucoside
7	21.7	281	326.1001	ND	ND	325.1264	119.0634/163.0562	<i>p</i> -coumaric acid glucoside
8	23.0	280/517	463.1240	463.1168	301.0626	ND	ND	Peonidin-3-O-glucoside
9	23.3	280/525	493.1346	493.1271	331.0750	ND	ND	Malvidin-3-O-glucoside
10	25.4	323	326.0637	ND	ND	325.0900	134.0510/149.0770/178.0480/193.0795	Fertaric Acid
11	26.2	280/519	491.1189	491.1076	287.0487	ND	ND	Cyanidin-3-O-6-O (acetyl)glucoside
12	27.4	281/520	757.1979	757.1892	287.0490/449.1049/595.1355	755.2551	285.0714/447.1343/593.1889	Cyanidin-3-(6-O- <i>p</i> -coumaryl),5-O diglucoside
13	29.2	280/522	771.2136	771.2022	301.0635/463.1162/609.15.14	ND	ND	Peonidin-3-(6-O- <i>p</i> -coumaroyl),5-O diglucoside
14	30.2	351	464.0955	465.0953	303.0439	463.1337	271.0593/300.0590/301.0788	Quercetin-3-O-glucoside
15	30.3	280/521	595.1451	595.1368	287.0486	ND	ND	Cyanidin-3-(6-O- <i>p</i> coumaryl)glucoside

<sup>a</sup>Numbered according to the chromatograms shown in Figure S2; <sup>b</sup>Retention time on the C18 column; <sup>c</sup>Maximum absorbance; <sup>d</sup>Not detected.

Table 6. Phenolic compounds concentration in the grape juice extracted by eight different commercial enzyme preparations.

Compounds	Tr <sup>a</sup>	$\lambda_{\max}$ (nm) <sup>b</sup>	Enzyme preparation								
			0	1	2	3	4	5	6	7	8
2-S-glutathionylcaftaric acid	17.1	327	6.50 <sup>c</sup>	6.74	7.77	7.12	7.04	6.73	10.63	10.62	9.73
Cyanidin-3,5-O-diglucoside	17.5	278/515	1.93 <sup>d</sup>	1.89	2.40	2.03	2.03	1.99	2.69	2.74	2.76
Caffeic acid-O-hexoside	19.1	322	2.45 <sup>c</sup>	2.50	2.88	2.43	2.50	3.72	3.67	4.07	4.17
Malvidin-3,5-O-diglucoside	19.5	278/518	3.70 <sup>d</sup>	3.59	4.52	3.63	3.87	4.46	5.74	6.07	6.40
Caftaric acid	20.6	320	7.44 <sup>c</sup>	13.97	13.66	11.26	12.42	12.11	15.23	17.48	21.63
Cyanidin-3-O-glucoside	20.8	280/516	6.00 <sup>d</sup>	6.38	8.54	6.42	6.51	5.81	8.43	7.95	8.52
<i>p</i> -coumaric acid glucoside	21.7	281	6.48 <sup>e</sup>	6.89	6.32	6.27	7.32	7.12	5.84	6.34	6.41
Peonidin-3-O-glucoside	23.0	280/517	1.02 <sup>d</sup>	1.21	1.42	1.12	1.29	1.12	1.41	1.37	1.34
Malvidin-3-O-glucoside	23.3	280/525	1.66 <sup>d</sup>	1.56	1.92	1.66	1.69	1.85	2.24	2.49	2.68
Fertaric Acid	25.4	323	3.75 <sup>f</sup>	3.85	3.83	3.53	4.03	3.71	3.55	3.63	3.50
Cyanidin-3-O-6-O-(acetyl)glucoside	26.2	280/519	1.03 <sup>d</sup>	1.03	1.45	1.18	1.10	1.03	1.74	1.76	1.88
Cyanidin-3-(6-O- <i>p</i> -coumaryl),5-O-diglucoside	27.4	281/520	2.38 <sup>d</sup>	2.48	3.29	2.77	2.61	2.55	3.34	3.53	4.00
Peonidin-3-(6-O- <i>p</i> -coumaroyl),5-O-diglucoside	29.2	280/522	1.58 <sup>d</sup>	1.59	2.16	1.78	1.71	1.94	2.48	2.70	3.03
Quercetin-3-O-glucoside	30.2	351	26.97 <sup>g</sup>	27.31	27.17	33.42	38.46	35.85	33.81	30.56	39.73
Cyanidin-3-(6-O- <i>p</i> -coumaryl)glucoside	30.3	280/521	1.30 <sup>d</sup>	1.16	1.68	1.37	1.51	1.14	1.71	1.77	1.98
Total anthocyanins (mg.L <sup>-1</sup> )			20.50	20.89	27.38	21.96	22.32	21.89	29.78	30.38	32.57
Total phenolic acids (mg.L <sup>-1</sup> )			26.61	33.95	34.46	30.61	33.31	33.39	38.92	42.14	45.44

<sup>a</sup>Retention time of an Atlantis C18 column (5  $\mu\text{m}$ ); <sup>b</sup> Maximum absorbance; <sup>c</sup>Quantified in Caffeic acid (mg.L<sup>-1</sup>); <sup>d</sup>Quantified in Cyanidin (mg.L<sup>-1</sup>); <sup>e</sup>Quantified in Coumaric acid (mg.L<sup>-1</sup>); <sup>f</sup>Quantified in Ferulic acid (mg.L<sup>-1</sup>); <sup>g</sup>Quantified in Quercetin (mg.L<sup>-1</sup>).

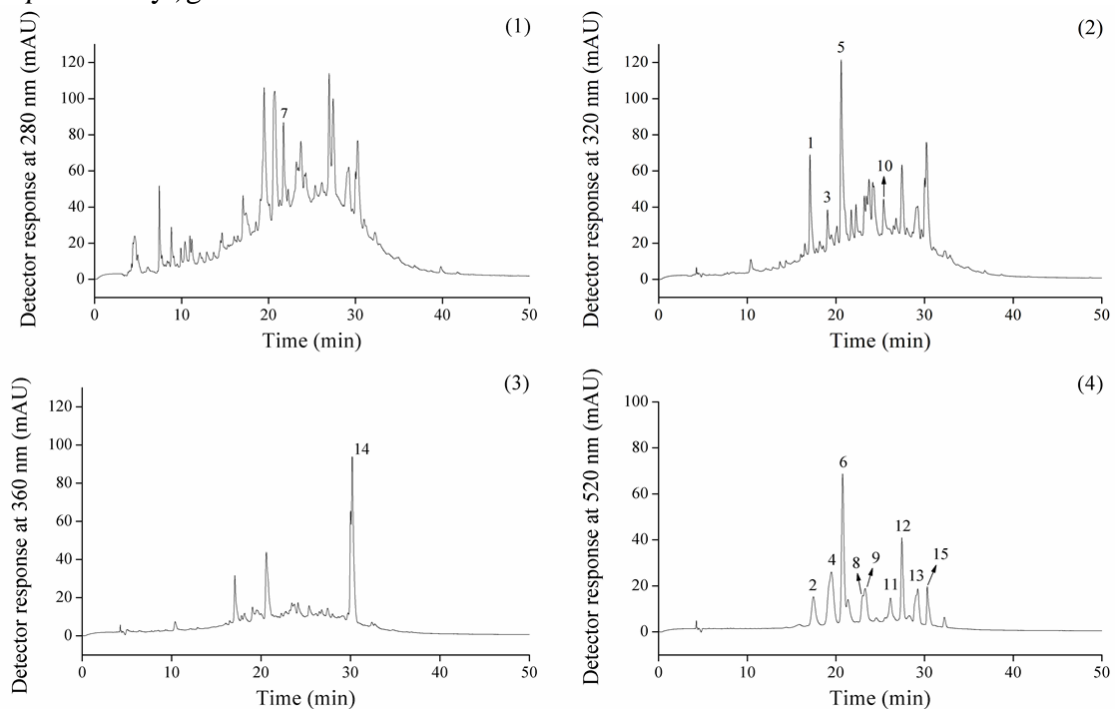
Regarding the anthocyanin profile of grape juice, it was observed a high amount of cyanidin-3-O-glucoside (up to  $8.54 \text{ mg.L}^{-1}$ ), which it is in agreement with the results obtained by Toaldo et al. (2015), who detected malvidin and cyanidin glucosides as the main anthocyanins in *Vitis labrusca* L. grapes. Anthocyanins are flavonoids widely distributed in nature and are responsible for most of the blue, violet and all shades of red, present in flowers and fruits. In grapes, anthocyanins constitute a large percentage of phenolic compounds, representing an important compound for the juice production, contributing to the sensory attributes, and mainly for the coloring (Muñoz-Espada et al. 2004). Moreover, the anthocyanins have a variety of bioactivities, such as antioxidant, cardioprotective, anticancer, anti-inflammation, anti-aging and antimicrobial activities (Xia et al. 2010).

The content of total phenolic acids ranged from  $26.61$  to  $45.44 \text{ mg.L}^{-1}$ , highlighting the caftaric acid as the main phenolic acid ( $7.44$  to  $21.63 \text{ mg.L}^{-1}$ ), followed, in descending order, by 2-S-glutathionylcaftaric acid ( $6.50$  to  $10.63 \text{ mg.L}^{-1}$ ), *p*-coumaric acid glucoside ( $5.84$  to  $7.32 \text{ mg.L}^{-1}$ ), caffeic acid-O-hexoside ( $2.43$  to  $4.17 \text{ mg.L}^{-1}$ ) and fertaric acid ( $3.50$  to  $4.03 \text{ mg.L}^{-1}$ ). The treatment with enzyme 8 rendered the highest values of total phenolic acid ( $45.44 \text{ mg.L}^{-1}$ ), especially the caftaric acid, which presented an increase of almost 3-times compared with the control treatment. Cantos et al. (2002) reported that the caftaric acid are the main phenolic acids of the grape, which it is associated an good vasodilatory and antimicrobial activity (Mudnic et al. 2010).

The major flavonol found in the grape juice was the quercetin-3-O-glucoside, ranging from  $26.97$  to  $39.73 \text{ mg.L}^{-1}$ . The highest concentrations were achieved in the juices treated with enzymes 4 ( $38.46 \text{ mg.L}^{-1}$ ) and 8 ( $39.73 \text{ mg.L}^{-1}$ ). When compared to the control, these enzymes (4 and 8) provided an increase of 42.6 % and 47.3 % in release of quercetin, respectively. According to Bonilla et al. (1999), the quercetin is one of the most effective antioxidant flavonoids. Some studies showed an inverse relationship between quercetin rich

diets and risk of cardiovascular diseases and the regulation of cancer promoter genes (Cantos et al. 2002; Castilla et al. 2006; Xia et al. 2010).

Figure 3. HPLC chromatograms of phenolics compounds in grape juice. Peak identification: **1.** 2-S-glutathionylcaftaric acid, **2.** Cyanidin-3,5-O-diglucoside, **3.** Caffeic acid-O-hexoside, **4.** Malvidin-3,5-O-diglucoside, **5.** Caftaric acid, **6.** Cyanidin-3-O-glucoside, **7.** *p*-coumaric acid glucoside, **8.** Peonidin-3-O-glucoside, **9.** Malvidin-3-O-glucoside, **10.** Fertaric acid, **11.** Cyanidin-3-O-6-O-(acetyl)glucoside, **12.** Cyanidin-3-(6-O-*p*-coumaryl),5-O-diglucoside, **13.** Peonidin-3-(6-O-*p*-coumaryl),5-O-diglucoside **14.** Quercetin-3-O-glucoside, **15.** Cyanidin-3-(6-O-*p*-coumaryl)glucoside.



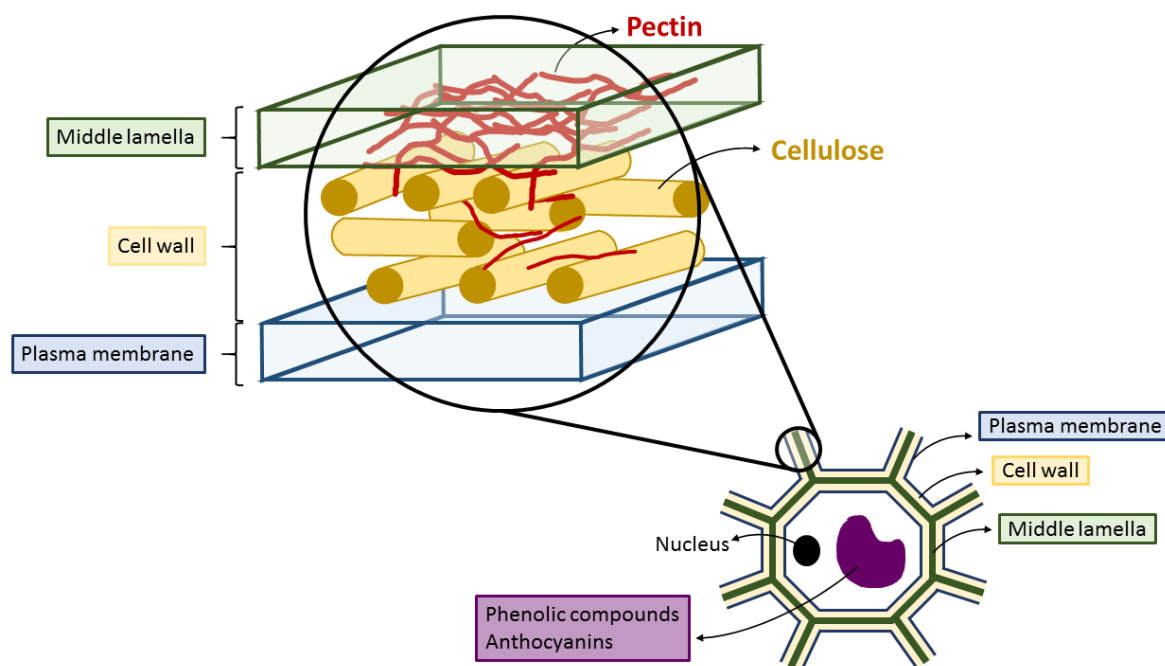
In general, the treatment with enzyme 8 (Lallzyme® Beta) provided the highest extraction of phenolic compounds. Recent works (Zietsman et al. 2015a; Zietsman et al. 2015b) have studied the polysaccharide cell wall composition of grape berries, showing the effects of different enzymes on the cell wall hydrolysis. These works show a synergistic effect between pectinases and xylanases, where the hydrolysis of pectin probably facilitated the access for the xylanases to their target, promoting a higher hydrolysis of the cell wall.

These findings are corroborated by Toaldo et al. (2014), who found concentrations of total phenolics, monomeric anthocyanins and antioxidant activity significantly higher in grape

juices prepared with enzymatic preparations that had in its composition, pectinases, hemicellulases and cellulases, when compared to grape juices prepared only with one of these enzymes.

The middle lamella of the grape cells is basically composed of pectin, and approaching the plasma membrane of the cells, the cellulosic complexes increase, being the secondary cell wall largely made up of cellulose microfibrils (40 – 80 %) (Pinelo et al. 2006). So, near to the plasma membrane there is high cellulose content, thus enzymatic preparations with higher concentrations of cellulase enzymes can provide higher release of intracellular components. It has been reported that phenols can be linked or entrapped in the polysaccharides of the cell walls, being confined in the cell vacuoles, or associated with cell nuclei through different chemical or physical bindings depending on the composition and nature of both phenols and polysaccharides (Pinelo et al. 2006). To better understand the effects of enzymatic hydrolysis on the grape berry cell, a simplified schematic of the plant cell wall was shown in **Fig. 4**. A more detailed structure of the grape berry and the distribution of the phenolic compounds can be found in Teixeira et al. (2013).

Figure 4. Simplified scheme of the cell wall structure.



### 3.5. Antioxidant capacity

Antioxidant capacity was determined by ABTS as well as the reducing capacity. The values varied from 30.06 to 39.65 mM and 1017 to 1436 mg.L<sup>-1</sup>, respectively (**Table 7**). The highest antioxidant capacity was also obtained by the treatment with enzyme 8 (Lallzyme® Beta), which allowed greater extraction of anthocyanins, phenolic acids and flavonoids. The treatment with enzymes 4 and 7 also provided juices with satisfactory antioxidant activity, probably due to the high extraction of quercetin and anthocyanins, respectively for these enzymes.

Several studies related to phytochemical composition of the grape and its derivatives, showing a wide range of compounds with antioxidant capacity presents in its composition, such as flavonoids, anthocyanins, catechins, phenolic acids, hydroxycinnamic acids and hydroxybenzoic acids (Dani et al. 2007; Moreno-Montoro et al. 2015; Lima et al. 2015; Mudnic et al. 2010; Badhani et al. 2015). Thus, it can be concluded that the enzyme preparation that allowed the higher extraction of phenolic compounds was also effective to

provide the highest antioxidant capacity. These findings are in agreement with Lima et al. (2014), which observed that the antioxidant capacity values increased with the increase of enzyme concentration and temperature, possibly due to the higher extraction of antioxidant phenolic compounds.

Another possible explanation for the result obtained using enzyme 8 is its high concentration of  $\beta$ -glucosidases. The use of  $\beta$ -glucosidases in the wine industry is potentially very interesting because they can promote the liberation of glycosylated aromatic and phenolic compounds, which can cause an increase in antioxidant capacity of the phenolic compounds (Todaro et al. 2008). However, the  $\beta$ -glucosidase is inhibited with high glucose contents, which could decrease its activity in grape juice.

Table 7. Analysis of antioxidant capacity of the juices treated with eight different commercial enzyme preparations.

<i>Enzyme preparation</i>	<b>Reducing capacity</b> (mg.L <sup>-1</sup> )	<b>ABTS</b> (mM)
Control	1017±16 <sup>d*</sup>	30.06±0.55 <sup>d*</sup>
1 – Pectinex Ultra SP-L	1231±11 <sup>c</sup>	34.90±2.26 <sup>bc</sup>
2 – Pectinex Ultra Color	1219±37 <sup>c</sup>	33.12±1.61 <sup>bcd</sup>
3 – Pectinex Smash XXL	1188±61 <sup>c</sup>	31.58±1.59 <sup>cd</sup>
4 – Novozym 33095	1287±70 <sup>bc</sup>	35.63±2.47 <sup>abc</sup>
5 – Pectinex Ultra Clear	1218±10 <sup>c</sup>	32.67±2.38 <sup>bcd</sup>
6 – Pectinex BE XXL	1226±24 <sup>c</sup>	34.00±0.71 <sup>bcd</sup>
7 – Rohapect 10L	1362±39 <sup>ab</sup>	36.72±0.27 <sup>ab</sup>
8 – Lallzyme Beta	1436±72 <sup>a</sup>	39.65±0.73 <sup>a</sup>

\*Means followed by the same letters in the same columns do not differ by Tukey's test at 5% probability

#### 4. Conclusion

The enzymatic treatment is an important step for the production of good quality grape juice. We demonstrated in our work that pectinolytic and cellulolytic enzymes had a great influence in the juice yield, as well as in the quality parameters and bioactive compounds composition.



Pectinex® Ultra Clear as well as Novozym® 33095 showed a good balance between PG and PME activities, resulting in higher yields. Moreover, enzymatic preparations with a good content of PL activity, such as Pectinex® BE XXL, also achieved good juice yields. Thus, it was observed that a good balance between these three pectinolytic enzymes are essential to improve juice yield, but the presence of high amounts of pectinlyase, or the combination of polygalacturonase and pectin methyl esterase can lead to similar results. On the other hand, enzymatic preparations with high content of cellulases, such as Lallzyme Beta®, favored a better extraction of sugar and phenolic compounds such as anthocyanins, flavonoids and phenolic acids, improving the juice color and increasing its antioxidant activity.

Finally, it is important for the juice industry to know the activities of different enzymes in the preparation, for an adequate choice, aiming a high extraction yield as well as a good quality juice, depending the characteristics of each raw material in terms of pectin and cell wall composition. In this work, Pectinex® Ultra Clear was the best preparation for extraction o grape juice yield from the variety Concord, while Lallzyme® Beta was the best preparation for improving the bioactive compounds concentration. Moreover, each grape variety has its own characteristics and compositions in terms of pectin, cellulose, hemicellulose and bioactive compounds, thus the presented results can be modified according when used other grape varieties. A good enzymatic preparation should contain pectinases for improving the juice yield and cellulases to obtain juices with higher quality and more beneficial composition to health, creating a product more attractive to consumers.

### **Acknowledgments**

This work was supported by grants and scholarships (L Dal Magro, D Goetze, N Paludo and C Ribeiro) from FAPERGS, CNPq (process 403505/2013-5), and CAPES. The

authors wish to thank Mr. Ramiro Martínez (Novozymes, Spain) and LNF Latino Americana for kindly supplying the enzymes used in this research, as well as Vitivinícola Jolimont (Canela, Brazil).

## References

- Abe, L. T., R. V. d. Mota, et al. (2007). "Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L." Food Science and Technology (Campinas) **27**: 394-400.
- Albershein, P. (1966). "Pectin lyase from fungi." Methods in Enzymology **8**: 628–631.
- Alkorta, I., C. Garbisu, et al. (1998). "Industrial applications of pectic enzymes: a review." Process Biochemistry **33**(1): 21-28.
- Arantes, V. and J. Saddler (2010). "Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis." Biotechnology for Biofuels **3**(1): 1-11.
- Badhani, B., N. Sharma, et al. (2015). "Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications." RSC Advances **5**(35): 27540-27557.
- Bonilla, F., M. Mayen, et al. (1999). "Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants." Food Chemistry **66**(2): 209-215.
- Buchert, J., J. M. Koponen, et al. (2005). "Effect of enzyme-aided pressing on anthocyanin yield and profiles in bilberry and blackcurrant juices." Journal of the Science of Food and Agriculture **85**(15): 2548-2556.
- Cantos, E., J. C. Espín, et al. (2002). "Varietal Differences among the Polyphenol Profiles of Seven Table Grape Cultivars Studied by LC–DAD–MS–MS." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(20): 5691-5696.
- Capanoglu, E., R. C. H. d. Vos, et al. (2013). "Changes in polyphenol content during production of grape juice concentrate." Food Chemistry **139**(1–4): 521-526.
- Castilla, P., R. Echarri, et al. (2006). "Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects." The American Journal of Clinical Nutrition **84**(1): 252-262.
- Chenchen, K., A. Yugawa, et al. (1984). "Enzymic Degumming of Pineapple and Pineapple Mill Juices." Journal of Food Science **49**(5): 1327-1329.
- Dani, C., L. S. Oliboni, et al. (2007). "Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally-produced grapes." Food and Chemical Toxicology **45**(12): 2574-2580.

- Demir, N., J. Acar, et al. (2001). "The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment." Journal of Food Engineering **47**(4): 275-280.
- Dudonné, S., X. Vitrac, et al. (2009). "Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays." Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**(5): 1768-1774.
- Ghose, T. K. (1987). "Measurement of Cellulase Activities." Pure and Applied Chemistry **59**: 257-268.
- Jayani, R. S., S. Saxena, et al. (2005). "Microbial pectinolytic enzymes: A review." Process Biochemistry **40**(9): 2931-2944.
- Kashyap, D. R., P. K. Vohra, et al. (2001). "Applications of pectinases in the commercial sector: a review." Bioresource Technology **77**(3): 215-227.
- Khandare, V., S. Walia, et al. (2011). "Black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus*) juice: Processing effects on antioxidant composition and color." Food and Bioprocess Processing **89**(4): 482-486.
- Lacerda, D. d. S., C. F. Santos, et al. (2014). "Antioxidant and hepatoprotective effects of an organic grapevine leaf (*Vitis labrusca* L.) extract in diabetic rats." RSC Advances **4**(95): 52611-52619.
- Landbo, A. K., K. Kaack, et al. (2007). "Statistically designed two step response surface optimization of enzymatic prepress treatment to increase juice yield and lower turbidity of elderberry juice." Innovative Food Science & Emerging Technologies **8**(1): 135-142.
- Lieu, L. N. and V. V. M. Le (2010). "Application of ultrasound in grape mash treatment in juice processing." Ultrasonics Sonochemistry **17**(1): 273-279.
- Lima, M. d. S., M. d. C. P. Dutra, et al. (2015). "Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced in industrial scale by different processes of maceration." Food Chemistry **188**(0): 384-392.
- Lima, M. d. S., I. d. S. V. Silani, et al. (2014). "Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil." Food Chemistry **161**(0): 94-103.
- Miller, G. L. (1959). "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar." Analytical Chemistry **31**(3): 426-428.
- Mojsov, K., J. Ziberoski, et al. (2011). "The effect of pectinolytic enzyme treatments on red grapes mash of Vranec on grape juice yields." Perspectives of Innovations, Economics & Business **7**(1): 84-86.
- Mojsov, K., J. Ziberoski, et al. (2010). "A comparison of effects of three commercial pectolytic enzyme preparations in red winemaking " Int. J. Pure Appl. Sci. Technol. **1**(2): 127-136

- Moreno-Montoro, M., M. Olalla-Herrera, et al. (2015). "Phenolic compounds and antioxidant activity of Spanish commercial grape juices." Journal of Food Composition and Analysis **38**(0): 19-26.
- Morris, J. R. and K. Striegler (1996). Grape juice: factors that influence quality, processing technology and economics. Fruits: major processed products. L. Somogyi. Lancaster, PA., Technomic Publishing Company: 328-348.
- Mudnic, I., D. Modun, et al. (2010). "Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine." Food Chemistry **119**(3): 1205-1210.
- Muñoz-Espada, A. C., K. V. Wood, et al. (2004). "Anthocyanin Quantification and Radical Scavenging Capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch Grapes and Wines." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(22): 6779-6786.
- Pinelo, M., A. Arnous, et al. (2006). "Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release." Trends in Food Science & Technology **17**(11): 579-590.
- Pinelo, M., B. Zeuner, et al. (2010). "Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity." Food and Bioprocess Processing **88**(2-3): 259-265.
- Re, R., N. Pellegrini, et al. (1999). "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." Free Radical Biology and Medicine **26**(9-10): 1231-1237.
- Rodrigues, E., L. R. B. Mariutti, et al. (2013). "Carotenoids and Phenolic Compounds from Solanum sessiliflorum, an Unexploited Amazonian Fruit, and Their Scavenging Capacities against Reactive Oxygen and Nitrogen Species." Journal of Agricultural and Food Chemistry **61**(12): 3022-3029.
- Romero-Cascales, I., J. M. Ros-García, et al. (2012). "The effect of a commercial pectolytic enzyme on grape skin cell wall degradation and colour evolution during the maceration process." Food Chemistry **130**(3): 626-631.
- Rouse, A. H. and C. D. Atkins (1952). "Heat inactivation of pectinesterase in citrus juices." Food Technology **6**: 291-294.
- Rowe, C. A., M. P. Nantz, et al. (2010). "Regular Consumption of Concord Grape Juice Benefits Human Immunity." Journal of Medicinal Food **14**(1-2): 69-78.
- Sandri, I. G., R. C. Fontana, et al. (2011). "Clarification of fruit juices by fungal pectinases." LWT - Food Science and Technology **44**(10): 2217-2222.
- Sankaran, A. K., J. Nijse, et al. (2015). "Effect of Enzyme Homogenization on the Physical Properties of Carrot Cell Wall Suspensions." Food and Bioprocess Technology.
- Singleton, V. L. and P. Esau (1969). "Phenolic substances in grapes and wine, and their significance." Advances in Food Research **1**(0065-2636 (Print)): 1-261.

Sowbhagya, H. B. and V. N. Chitra (2010). "Enzyme-assisted extraction of flavorings and colorants from plant materials." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **50**(1549-7852 (Electronic)): 146–161.

Tapre, A. R. and R. K. Jain (2014). "Pectinases: Enzymes for fruit processing industry." International Food Research Journal **21**(2): 447-453.

Teixeira, A., J. Eiras-Dias, et al. (2013). "Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments." International Journal of Molecular Sciences **14**(9): 18711.

Tiwari, B. K., A. Patras, et al. (2010). "Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice." Ultrasonics Sonochemistry **17**(3): 598-604.

Toaldo, I. M., F. A. Cruz, et al. (2015). "Bioactive potential of Vitis labrusca L. grape juices from the Southern Region of Brazil: Phenolic and elemental composition and effect on lipid peroxidation in healthy subjects." Food Chemistry **173**(0): 527-535.

Toaldo, I. M., J. S. d. Gois, et al. (2014). "Phytochemical Polyphenol Extraction and Elemental Composition of Vitis labrusca L. Grape Juices Through Optimization of Pectinolytic Activity." Food and Bioprocess Technology **7**(9): 2581-2594.

Todaro, A., R. Palmeri, et al. (2008). "Increase of trans-resveratrol in typical Sicilian wine using  $\beta$ -Glucosidase from various sources." Food Chemistry **107**(4): 1570-1575.

Villena, M. A., J. F. Ú. Iranzo, et al. (2007). " $\beta$ -Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology." Enzyme and Microbial Technology **40**(3): 420-425.

Xia, E. Q., G. F. Deng, et al. (2010). "Biological Activities of Polyphenols from Grapes." International Journal of Molecular Sciences **11**(2): 622-646.

Zietsman, A. J. J., J. P. Moore, et al. (2015). "Following the Compositional Changes of Fresh Grape Skin Cell Walls during the Fermentation Process in the Presence and Absence of Maceration Enzymes." Journal of Agricultural and Food Chemistry **63**(10): 2798-2810.

Zietsman, A. J. J., J. P. Moore, et al. (2015). "Profiling the Hydrolysis of Isolated Grape Berry Skin Cell Walls by Purified Enzymes." Journal of Agricultural and Food Chemistry **63**(37): 8267-8274.

#### **CAPÍTULO 4 - Synergistic effects of Pectinex® Ultra Clear and Lallzyme® Beta on yield and bioactive compounds extraction of Concord grape juice**

Neste trabalho estudou-se o efeito sinérgico da Pectinex® Ultra Clear (PUC) com Lallzyme® Beta (LB) na extração do suco de uva. Primeiramente, as condições ótimas de extração do suco foram encontradas através de um delineamento de composto central (DCC) e a metodologia de superfície de resposta (MSR), avaliando as seguintes variáveis: temperatura, tempo, concentração de enzima e razão de PUC/LB, tendo como variáveis de resposta o rendimento e a capacidade redutora dos sucos. Após, encontradas as condições ótimas de extração, a mistura dos dois preparados enzimáticos (PUC/LB) e os preparados em separado foram utilizados para a produção do suco de uva. Parâmetros de qualidade como cor, sólidos solúveis totais (°Brix), açúcares redutores, acidez total, pH e capacidade antioxidante foram determinados para essas amostras, e os compostos fenólicos e antocianinas foram identificados e quantificados por HPLC-DAD-MS. Os resultados estão apresentados na forma de um manuscrito submetido para publicação na revista *LWT- Food Science and Technology*.

**Synergistic effects of Pectinex® Ultra Clear and Lallzyme® Beta on yield and bioactive compounds extraction of Concord grape juice**

Lucas Dal Magro<sup>1</sup>, Luiza Dalagnol<sup>1</sup>, Vitor Manfro<sup>2</sup>, Plinho F. Hertz<sup>1</sup>, Manuela P. Klein<sup>1,3</sup>,  
Rafael C. Rodrigues<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology, Bioprocess and Biocatalysis Group, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Beverages Technology Lab, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Bioprocesses, State University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

\* Corresponding author:

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

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

## Abstract

In this work, the synergistic effects of the combination of Pectinex® Ultra Clear (PUC), presenting high pectinase activity, and Lallzyme® Beta (LB), presenting cellulase activity were tested for grape juice extraction from *Vitis labrusca* L. variety Concord. The variables time, temperature, enzyme concentration and PUC/LB ratio were analyzed with the responses juice yield and reducing capacity. PUC improved the juice yield while LB increased the reducing capacity. However, the mix PUC/LB provided an increase in juice yield and reducing capacity, reaching to 75.8% and 1090 mg.L<sup>-1</sup>, respectively. The best conditions for grape juice extraction were: 51 °C, 52 min, 0.75 U.g<sup>-1</sup> and PUC/LB ratio 0.52. Twenty-three phenolic compounds were identified and quantified by HPLC-DAD-MS, where the content of quercetin 3-O-glucoside and total anthocyanins were improved up to 112% and 41%, respectively. The mix of two enzymatic preparations improved the juice yield and bioactive compounds extraction when compared with each preparation individually. The appropriate choice of enzymatic preparation and the extraction conditions are very important in the juice yield and quality for food industries.

Keywords: pectinase; cellulase; grape juice extraction; bioactive compounds; antioxidant activity.



## 1. Introduction

Grape juice is a fresh and nutritional beverage, highly appreciated worldwide, its production is significantly increasing every year. Among grape cultivars, *Vitis labrusca* L. variety Concord is the most widely used for juice production, due to its quality, providing a highly aromatic juice with good nutritional and healthy properties (Morris & Striegler, 1996; Stalmach, Edwards, Wightman, & Crozier, 2011).

Phenolic compounds of the grape juice such as flavonoids, anthocyanins, tannins, phenolic acids, among others, are the main responsible for the beneficial healthy effects observed (Capanoglu, Vos, Hall, Boyacioglu, & Beekwilder, 2013). Polyphenols are usually found in grape skins, and their extraction needs the degradation of the middle lamella and cell wall to allow their contents to be extracted or diffused into the juice (Bautista-Ortín, Martínez-Cutillas, Ros-García, López-Roca, & Gómez-Plaza, 2005). The porosity of this barrier can be increased by partial hydrolysis of the polysaccharide constituents (pectin, hemicellulose, cellulose), that can be achieved using maceration enzymes (Romero-Cascales, Ros-García, López-Roca, & Gómez-Plaza, 2012).

In the production of grape juice, enzyme-catalyzed degradation of cell walls, by cellulases, helps the release of bioactive compounds, enhancing the recovery of phenols and anthocyanins, which otherwise would be lost in pressed residues. Besides, the use of pectinolytic enzymes during the maceration prior pressing is a prerequisite for obtaining satisfactory juice yield (Khandare, Walia, Singh, & Kaur, 2011). Among some commercial enzyme preparations, Pectinex® Ultra Clear (Novozymes) are known by its high pectinase activity and, on the other hand, Lallzyme® Beta (Lallemand Wine) by its high cellulase activity. Although both preparations are composed by pectinases and cellulases, they are used by different purposes, and additionally, their composition is much different, which makes that each one is traditionally applied separately in wine and juice processing.

Previously, we evaluated eight different enzymatic preparations for grape juice production, analyzing the extraction of bioactive compounds, yield and juice quality (Dal Magro et al., 2016). Among these preparations, Lallzyme® Beta (LB) and Pectinex® Ultra Clear (PUC) provided the best results, increasing individually, the antioxidant activity and yield, respectively. Based on these aspects, the objective of the present work was to evaluate and to compare the synergistic effect of these two commercial enzymatic preparations, PUC and LB, on the juice yield and bioactive compounds extraction. For this, a central composite design (CCD) and the response surface methodology (RSM) were used to evaluate the variables temperature, time, enzyme concentration and PUC/LB ratio. In the CCD, juice yield and reducing capacity were analyzed as responses, and the best conditions to improve both responses simultaneously were defined. Moreover, the grape juice was characterized for color, total soluble solids (°Brix), reducing sugars, total acidity, pH, and antioxidant activity. Additionally, phenolic compounds and anthocyanins were quantified and identified by HPLC and mass spectrometry.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Material**

Grapes from Concord variety were donated by Vitivinícola Jolimont (Canela, RS, Brazil). Pectinex® Ultra Clear and Lallzyme® Beta were acquired from Novozymes (Spain) and Lallemand Wine (France), respectively. Pectin (ID 76282), polygalacturonic acid, galacturonic acid, gallic acid, caffeic acid, quercetin, ferulic acid, coumaric acid, cyanidin, trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) and Folin-Ciocalteu were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Formic acid, acetonitrile and methanol HPLC grade were from Panreac Quimica SL (Barcelona, Spain). All solvents and other chemicals

were of analytical or HPLC grade. The samples and solvents were filtered through Millipore® membranes of 0.22 and 0.45  $\mu\text{m}$ , respectively.

## 2.2. Methods

Experiments were performed in triplicates, and the results are expressed as the mean standard deviation (SD).

### 2.2.1. Enzymatic activities

For pectinase (PE) and polygalacturonase (PG) activities, pectin and polygalacturonic acid were used as substrates, respectively. The diluted enzyme (0.1 mL) was added to the substrate (0.9 mL, 1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) prepared in sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.8), and incubated at 37 °C, during 1 min for PE and 2 min for PG. The amount of reducing groups was estimated by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method, according to Miller (1959). One PE and PG unit were defined as the amount of enzyme required to release 1  $\mu\text{mol}$  of reducing groups per min under the reaction conditions.

Pectinlyase (PL) activity was estimated measuring the increase in the absorbance at 235 nm, due to the formation of unsaturated products, as described by Albersheim (1966), with modifications. Briefly, the diluted enzyme (0.05 mL) was added to the pectin solution (0.95 mL, 4  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) prepared in sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.8) and incubated at 37 °C during 1 min. The reaction was stopped by adding 3 mL of 0.5 M HCl. One PL unit was defined as the amount of enzyme that produces 1 nmol of unsaturated uronide ( $\epsilon = 5500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  at 235 nm) per min under the reaction conditions.

Pectin methyl esterase (PME) activity was determined by titration of carboxylic groups liberated through the de-esterification of citric pectin, as described by Rouse and Atkins (1952), with modifications. The diluted enzyme (0.1 mL) was added to the pectin

solution (9.9 mL, 5 g.L<sup>-1</sup>) prepared in NaCl buffer (0.15 M, pH 4.5). The reaction was carried out at 30 °C during 10 min. Samples were titrated with NaOH (0.02 M) until the pH 4.5. One PME unit was defined as the amount of enzyme which liberates 1 milliequivalent of carboxyl groups per minute under the reaction conditions cited above.

Total cellulase (CE) activity was determined using Whatman n°1 filter paper as substrate, following the method proposed by Ghose (1987), with modifications. The enzyme preparation previously diluted (0.5 mL) was added to 0.5 mL of sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.8) containing 50 mg of filter paper. The reaction was carried out at 50 °C during 5 min, under agitation. The released reducing sugars were estimated by the DNS method according to Miller (1959). One CE unit was defined as the amount of enzyme required to release 1 µmol of reducing groups per min under the reaction conditions.

### 2.2.2. Extraction of grape juice

100 g of grape berries were gently separated from the rachis, washed and then crushed by hand with a pestle. Afterwards, 1 mL of enzyme solution, properly diluted, was added and the mixture incubated, under agitation, in a thermostatically controlled water bath. Time and temperature were defined according to the experimental design. Following the enzyme application, the juice was pressed, analyzed and stored at -18 °C. The grape juice yield (JY) was calculated according to the equation 1:

$$JY (\%) = \frac{\text{mass of juice}}{\text{initial mass of grapes}} \times 100 \quad (1)$$

### 2.2.3. Experimental design

A 2<sup>4</sup> central composite design (CCD) was applied to determine the optimized conditions for improving the grape juice yield and extraction of bioactive compounds. The

four independent variables were temperature, time, enzyme concentration and enzyme ratio (PUC/LB) (Table 1). The experimental design consisted of sixteen factorial points, eight axial points (two axial points on the axis of design variable), and four replications at the central point, leading to 28 sets of experiments as shown in Table 2. Regression analysis was performed and an empiric second order polynomial model was fitted to the data (Equation 2).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 \quad (2)$$

where  $Y$  is the response variable,  $\beta_0$  the constant,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$ ,  $\beta_{ij}$  were the coefficients for the linear, quadratic, and for the interaction effects, respectively, and  $X_i$  and  $X_j$  the coded level of variables  $x_i$  and  $x_j$ . The above quadratic equation was used to plot surfaces for all variables. Statistica 12.0 software (Statsoft, USA) was used for regression and graphical analysis.

Table 1. Process variables and their coded and real levels used in CCD.

Variables	Name	Coded Levels				
		-2	-1	0	1	2
X <sub>1</sub>	Temperature (°C)	30	40	50	60	70
X <sub>2</sub>	Time (min)	15	30	45	60	75
X <sub>3</sub>	Enzyme concentration (U.g <sup>-1</sup> )	0.1	0.325	0.55	0.775	1.0
X <sub>4</sub>	PUC/LB ratio	0	0.25	0.5	0.75	1.0

#### 2.2.4. Total acidity, pH, soluble solids (°Brix) and reducing sugars.

For total acidity, the diluted juice was titrated with a 0.1 M NaOH, using phenolphthalein as indicator and it was expressed in g.L<sup>-1</sup> of tartaric acid. The pH of the juice was determined using a digital pHmeter. Soluble solids (°Brix) were measured using a refractometer at 20.0 ± 0.5 °C. The reducing sugars were quantified by the DNS method (Miller, 1959).

Table 2. Experimental design and results of CCD.

Run	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	Juice yield (%)	Reducing capacity (mg.L <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	-1	-1	70.08	621
2	-1	-1	-1	1	72.58	552
3	-1	-1	1	-1	71.49	682
4	-1	-1	1	1	76.99	603
5	-1	1	-1	-1	70.81	751
6	-1	1	-1	1	72.93	616
7	-1	1	1	-1	75.39	774
8	-1	1	1	1	77.35	703
9	1	-1	-1	-1	69.89	1104
10	1	-1	-1	1	69.90	1049
11	1	-1	1	-1	68.61	1219
12	1	-1	1	1	69.05	1174
13	1	1	-1	-1	68.09	1221
14	1	1	-1	1	67.96	1077
15	1	1	1	-1	68.78	1240
16	1	1	1	1	69.08	1174
17	-2	0	0	0	74.70	592
18	2	0	0	0	68.21	997
19	0	-2	0	0	72.04	598
20	0	2	0	0	76.61	939
21	0	0	-2	0	72.77	716
22	0	0	2	0	76.38	988
23	0	0	0	-2	71.38	1003
24	0	0	0	2	75.49	822
25	0	0	0	0	76.44	969
26	0	0	0	0	76.84	929
27	0	0	0	0	76.30	985
28	0	0	0	0	76.00	934

### 2.2.5. Color determination

Determination of juice color was performed in a Minolta Colorimeter (Model CR-400, Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japan) based on 3 color coordinates:  $L^*$  (whiteness or brightness/darkness),  $a^*$  (redness/greenness) and  $b^*$  (yellowness/ blueness). The hue angle ( $h^*$ ), Chroma ( $C^*$ ) and Color difference ( $\Delta E^*_{ab}$ ) were calculated following equations 2, 3 and 4, respectively:

$$h^* = \text{atan}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (3)$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (4)$$

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (5)$$

#### 2.2.6. HPLC-DAD-MS analysis of phenolic compounds

Phenolic compounds were determined according to Rodrigues, Mariutti, and Mercadante (2013). Chromatographic analyses were performed using a Shimadzu HPLC (Kyoto, Japan) connected in series to a diode array detector and a mass spectrometer with an Q-TOF analyzer and electrospray ionization (ESI) source (Bruker Daltonics, model micrOTOF-QIII, Bremen, Germany).

The phenolic compounds were separated in a Synergi 4 $\mu$  Hydro-RP C<sub>18</sub> column (4  $\mu$ m, 250  $\times$  4.6 mm, Phenomenex, USA) at a flow rate of 0.7 mL.min<sup>-1</sup>, column temperature at 29 °C, using a mobile phase consisting of water/formic acid (99.5:0.5, v/v) (solvent A) and acetonitrile/formic acid (99.5:0.5, v/v) (solvent B) in a linear gradient from A/B 99:1 to 50:50 in 50 min; then from 50:50 to 1:99 in 5 min. The former ratio (1:99) was maintained for additional 5 min. The chromatograms were processed at 280, 320, 360 and 520 nm. The phenolic compounds were identified on the basis of the following information: elution order and retention time in the reversed phase column, UV–Vis and MS spectra features compared to standards analyzed under the same conditions, and data available in the literature.

#### 2.2.7. Antioxidant capacity

Antioxidant capacity was estimated using two *in vitro* assays: ABTS and reducing capacity. ABTS assay was performed as described by Re et al. (1999). The grape juice was diluted to produce between 20–80% of inhibition of the initial ABTS absorbance. An aliquot of 300  $\mu$ L of the sample was added to 2.7 mL of ABTS radical solution and the decrease of

absorbance at 750 nm was recorded during 6 min in a spectrophotometer. Trolox was used as standard for the calibration curves and results were expressed as equivalents of Trolox (mmol) per liter of grape juice.

The reducing capacity was determined by the Folin-Ciocalteu method, as proposed by Singleton and Esau (1969), with some modifications. 20  $\mu\text{L}$  of grape juice, 1.68 mL of Folin-Ciocalteu reagent and 300  $\mu\text{L}$  of sodium carbonate buffer were mixed in assay tubes. After 2 h of reaction in the dark, the absorbance was measured at 765 nm. The results were expressed as equivalents of gallic acid (mg) per liter of grape juice.

### **3. Results and discussion**

#### **3.1. Enzymatic activity of commercial preparations**

In order to characterize the PUC and LB preparations, 5 enzymatic activities (total pectinase, PE; polygalacturonase, PG; pectinlyase, PL; pectin methyl esterase, PME; and total cellulase, CE) were measured and the results are shown in Table 3. It was observed that PUC had higher concentration of pectinolytic enzymes in its composition, mainly in the PG activity, which was  $9090.32 \text{ U.mL}^{-1}$ , while for LB was  $3912.18 \text{ U.mL}^{-1}$ . PUC stands out also for its high PME activity ( $4254.44 \text{ U.mL}^{-1}$ ) compared to LB (not detected). On the other hand, LB has a CE activity significantly higher than PUC,  $1134.36 \text{ U.mL}^{-1}$  and  $72.40 \text{ U.mL}^{-1}$ , respectively. Thus, based on the composition of each preparation, in the next experiments, both preparations will be mixed aiming to improve the extraction of juice and bioactive compounds from grape.



Table 3. Total pectinase activity (PE), polygalacturonase (PG), pectinlyase (PL), pectin methylesterase (PME) and cellulase (CE) in commercial enzyme preparations.

Enzyme preparation	Enzyme Activity				
	PE (U.mL <sup>-1</sup> )	PG (U.mL <sup>-1</sup> )	PL (U.mL <sup>-1</sup> )	PME (U.mL <sup>-1</sup> )	CE (U.mL <sup>-1</sup> )
Pectinex® Ultra Clear (PUC)	7875.97	9090.32	792.57	4254.44	72.40
Lallzyme® Beta (LB)	4226.32	3912.18	186.18	0.00	1134.36

### 3.2. Model fitting and ANOVA

The results for the 28 experiments performed in the CCD are presented in Table 2. Among the treatments, the highest juice yield (77.35 %) was obtained for the treatment 8 (40 °C; 60 min; 0.775 U.g<sup>-1</sup> of pectinases; PUC/LB ratio, 0.75), while for reducing capacity, the highest value (1240 mg.L<sup>-1</sup>) was for the treatment 15 (60 °C; 60 min; 0.775 U.g<sup>-1</sup> of pectinases; PUC/LB ratio, 0.25). It can be clearly noted the effects of temperature, as well as, PUC/LB ratio in each response. Low temperatures and high PUC/LB ratio improved juice yield, while high temperatures and low PUC/LB ratio increased the reducing capacity. The proposed model was adjusted to the experimental data using a second-order polynomial equation and the adequacy of the model was performed by analysis of variance and by the coefficient of determination ( $R^2$ ). The second-order polynomial equation that describes the behavior of juice yield and reducing capacity are presented in Eq. (6) and Eq. (7), respectively.

$$Y_1 = 76.40 - 2.05X_1 - 1.61X_1^2 + 0.45X_2 - 0.89X_2^2 + 0.90X_3 - 0.83X_3^2 + 0.87X_4 - 1.12X_4^2 - 0.55X_1X_2 - 0.95X_1X_3 - 0.71X_1X_4 + 0.44X_2X_3 \quad (6)$$

$$Y_2 = 942.36 + 198.64X_1 - 24.92X_1^2 + 51.46X_2 - 31.40X_2^2 + 46.86X_3 - 42.68X_4 \quad (7)$$

Where  $Y_1$  and  $Y_2$ , are the percentage of juice yield and reducing capacity values, respectively, and  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ , and  $X_4$  are the coded values for temperature, time, enzyme concentration, and PUC/LB ratio, respectively. Statistical analysis of the model was made by the Fisher's statistical test for analysis of variance (ANOVA). The computed F-values were 6.24 ( $p = 0.0011$ ) for juice yield, and 6.33 ( $p < 0.0001$ ) for reducing capacity, both highly significant. Both responses showed a determination coefficient of  $R^2 = 0.86$  and correlation coefficient of  $R = 0.93$ , suggesting a highly satisfactory representation of the process model and good correlation between the experimental results and the theoretical values predicted by the model equation.

### 3.3 Effect of parameters

The linear, quadratic, and the interaction effects of the variables temperature, time, enzyme concentration and PUC/LB ratio are presented in Table 4. All linear effects were statistically significant, being the temperature the one that showed the highest effect for both responses.

For juice yield, the temperature presented a negative effect, which means that an increase in its value will reduce the response. This yield reduction can be explained by enzyme inactivation at elevated temperatures. Temperature may increase enzymatic activity as long as it is below to the enzyme denaturation temperature (Tapre & Jain, 2014). The variables time, enzyme concentration and PUC/LB ratio presented positive effects, which means that an increase in their values will increase the response. In general, the time needed to obtain a good enzymatic extraction is inversely proportional to the enzyme concentration used at an optimum temperature (Kashyap, Vohra, Chopra, & Tewari, 2001). When used longer times and high enzyme concentrations there was not observe any increase in juice yield.

Table 4. Statistical analysis of the CCD.

Variable	Juice yield			Reducing capacity		
	Effect	Standard error	p-Value	Effect	Standard error	p-Value
Mean	76.39*	0.17	<0.0001	954.15*	13.56	<0.0001
Linear						
X <sub>1</sub>	-4.10*	0.14	<0.0001	397.27*	11.07	<0.0001
X <sub>2</sub>	0.91*	0.14	0.0076	102.92*	11.07	0.0026
X <sub>3</sub>	1.80*	0.14	0.0010	93.72*	11.07	0.0034
X <sub>4</sub>	1.74*	0.14	0.0011	-85.35*	11.07	0.0045
Quadratic						
X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	-3.22*	0.14	0.0002	-53.76*	11.07	0.0166
X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	-1.79*	0.14	0.0011	-66.73*	11.07	0.0091
X <sub>3</sub> X <sub>3</sub>	-1.66*	0.14	0.0013	-24.94	11.07	0.1096
X <sub>4</sub> X <sub>4</sub>	-2.23*	0.14	0.0006	5.30	11.07	0.6643
Interactions						
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-1.10*	0.17	0.0077	-27.58	13.56	0.1348
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	-1.89*	0.17	0.0016	16.87	13.56	0.3017
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	-1.42*	0.17	0.0037	5.76	13.56	0.6995
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.88*	0.17	0.0143	-15.64	13.56	0.3323
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	-0.52	0.17	0.0555	-20.99	13.56	0.2193
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	0.46	0.17	0.0759	17.70	13.56	0.2829

\*Statistically significant at 95 % of confidence level.

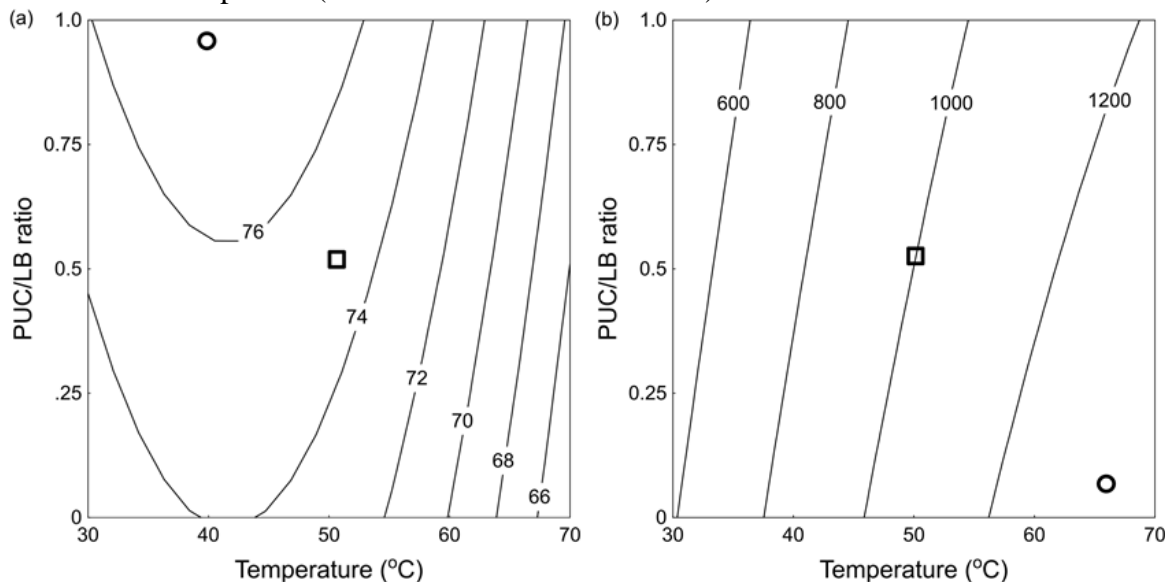
For PUC/LB ratio, the results can be explained by the good activities of the enzymes of the pectinolytic complex (PG, PME and PL) of PUC. PME catalyzes the de-esterification of the methoxyl group of pectin, being essential for the action of other enzymes such as PG that catalyzes the hydrolysis of  $\alpha$ -1,4 linkages, acting on low methoxyl pectin (Alkorta, Garbisu, Llama, & Serra, 1998; Jayani, Saxena, & Gupta, 2005). Therefore, the low value of PME presented in the Lallzyme® Beta was not enough to de-esterify the pectin, impeding its hydrolysis by PG. Besides, the lower PL values of the Lallzyme® Beta also contributed to the lower yields obtained when this preparation was used individually. Pectinlyases are responsible for catalyzing the  $\beta$ -elimination, of the main chain of the pectic polysaccharide,

acting on pectin with high degree of methylation (Kashyap et al., 2001; Tapre & Jain, 2014), without the need of other enzymes with de-esterification activity.

Regarding the results of the reducing capacity, excepting for PUC/LB ratio, all variables presented positive effects. These results are consistent with some studies, showing that the temperature acts on the cell wall degradation of grape cells, aiding to the extraction of intracellular compounds (Cabrera et al., 2009). For PUC/LB ratio, a negative effect on reducing capacity was observed by increasing this parameter. Best results were found using higher amounts of LB, which can be explained by the higher cellulase content in this preparation. Analyzing the structure of the grape cell wall, the higher pectin content is located on the middle lamella of the grape cells, and when approaching the plasma membrane of the cells, the layer of pectin decreases, while the cellulose complex increase (Alkorta et al., 1998). The secondary cell wall is largely made up of cellulose microfibrils (40 – 80 %) (Pinelo, Arnous, & Meyer, 2006). Near to the plasma membrane there is high cellulose content, thus enzymatic preparations with higher concentrations of cellulases can provide an efficient hydrolysis of cell wall, enhancing the release of phenolic compounds and anthocyanins, presented in the grape cells, to the juice.

The relationship between variables and responses can be better understood by examining the contour plots depicted in Fig. 1. It can be seen the influence of PUC/LB ratio versus temperature for the juice yield and reducing capacity, showing an inverse behavior of these variables for each response. The best condition to improve juice yield is different than those to improve reducing capacity. However, at intermediate conditions for both variables it is possible to obtain good juice yield and reducing capacity. Thus, since in the work, the goal is to maximize both responses, these variables were fixed in a condition that provided an increase in yield and antioxidant capacity simultaneously.

Figure 1. Contour plots for (a) juice yield and (b) reducing capacity for PUC/LB ratio versus temperature. In each figure, the missing variables were fixed at the optimal point (○) condition for maximal extraction for each separate response, (□) optimal condition for maximize both responses (51 °C and 0.52 PUC/LB ratio) .



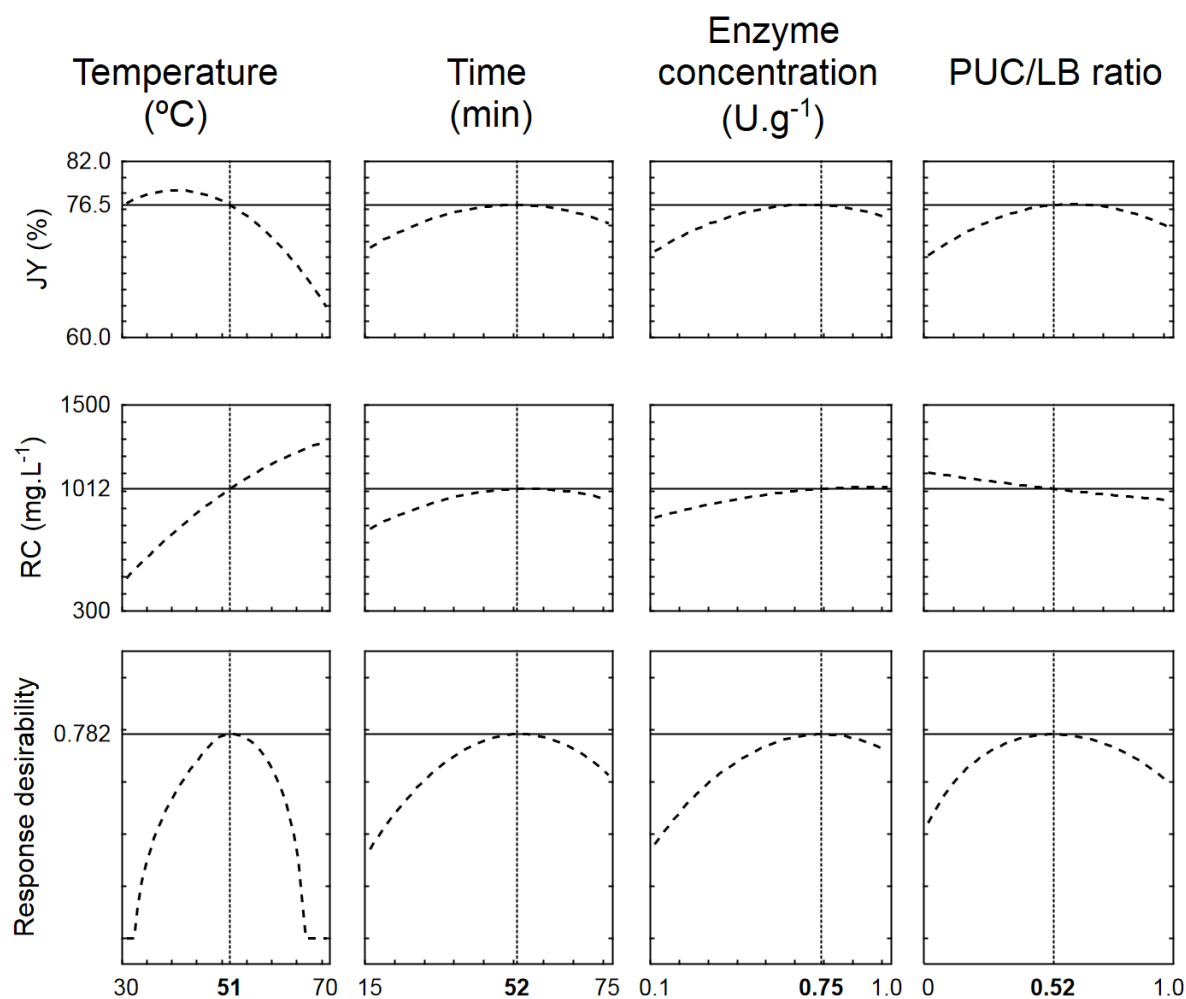
### 3.4. Optimal reaction conditions and model validation

In order to maximize both juice yield and bioactive compounds, the optimal conditions for the extraction of grape juice were determined by the response desirability profile calculated using Statistica 12.0. The optimal value of each variable was obtained at the desirability point, where it was possible to reach the maximal response for juice yield and reducing capacity at the same time. The profiles for the predicted values of the four variables are shown in Fig. 2. The optimum conditions were: temperature, 51 °C; time, 52 min; enzyme concentration, 0.75 U.mL<sup>-1</sup>; and PUC/LB ratio, 0.52. It is clearly noted that if each response was optimized individually, the extraction conditions would be different for each one, as also observed in Fig. 1.

In order to validate the prediction models, experiments were carried out under optimal conditions, obtaining  $75.8 \pm 0.9$  % for the juice yield and  $1090 \pm 67$  mg.L<sup>-1</sup> for reducing capacity. Experimental results showed good correlation with the theoretical value predicted

by the models (Eq. 6 and 7), which were 76.5 % and 1013 mg.L<sup>-1</sup> for juice yield and reducing capacity, respectively.

Figure 2. Prediction profiles for the variables tested in the CCD. JY: juice yield; RC: reducing capacity. Response desirability maximizing both responses at the same time.



### 3.5. Grape juice characterization

For a complete characterization, juices were prepared using each preparation individually, the best mix defined by the RSM, and a control without enzyme. The juices were prepared under optimized conditions for time, temperature and enzyme concentration. All juices were characterized for yield, pH, total acidity, soluble solids (°Brix), reducing sugars, color, phenolic compounds and antioxidant capacity, and the results are presented in Table 5.

### *3.5.1. Juice yield*

Regarding the juice yield, it can be seen that the combination of the two enzymatic preparations (PUC/LB) provided the highest yields of juice (75 %), representing an increase of 8.2 % when compared to the control treatment. This treatment was equal statistically when compared with the treatment with Pectinex® Ultra Clear.

The composition of polygalacturonase, pectin lyase and pectin methyl esterase of Pectinex® Ultra Clear, combined with the highest cellulase activity of Lallzyme® Beta provided an extensive degradation of the middle lamella and cell wall of grapes. The synergistic effect of pectinases and cellulases is the crucial part of the process of enzymatic treatment of pulp to an almost complete liquefaction of pulped fruit and vegetables, increasing the extraction yield (Demir, Acar, Sarıoğlu, & Mutlu, 2001).

Table 5. Analysis of yield, pH, Total acidity, °Brix, Reducing sugars and color of the juices prepared with different enzymatic treatments.

Enzyme preparation	Analysis										
	Juice yield (%)	pH	Total acidity (g.L <sup>-1</sup> )	°Brix	Reducing sugars (g.L <sup>-1</sup> )	L*	a*	b*	C*	h*	ΔE* <sub>ab</sub>
Control	69.85±0.76 <sup>b#</sup>	3.30±0.02 <sup>a</sup>	9.99±0.43 <sup>b</sup>	14.75±0.05 <sup>c</sup>	186.18±2.80 <sup>c</sup>	58.07±0.30 <sup>a</sup>	51.61±0.17 <sup>c</sup>	21.20±0.68 <sup>c</sup>	55.79±0.42 <sup>c</sup>	0.39±0.01 <sup>a</sup>	-
PUC	75.23±0.95 <sup>a</sup>	3.18±0.02 <sup>b</sup>	11.58±0.17 <sup>a</sup>	15.00±0.10 <sup>bc</sup>	193.40±1.50 <sup>b</sup>	54.35±1.31 <sup>ab</sup>	53.41±0.36 <sup>b</sup>	22.55±0.53 <sup>bc</sup>	57.98±0.13 <sup>b</sup>	0.41±0.02 <sup>a</sup>	4.42±0.58 <sup>b</sup>
LB	70.70±0.21 <sup>b</sup>	3.28±0.02 <sup>a</sup>	10.51±0.15 <sup>b</sup>	15.35±0.15 <sup>a</sup>	200.37±2.05 <sup>a</sup>	53.70±2.07 <sup>b</sup>	54.68±0.43 <sup>a</sup>	23.33±0.41 <sup>ab</sup>	59.45±0.43 <sup>a</sup>	0.40±0.02 <sup>a</sup>	5.91±0.90 <sup>ab</sup>
PUC/LB (52 % of PUC in the mix)	75.83±0.92 <sup>a</sup>	3.19±0.01 <sup>b</sup>	11.21±0.23 <sup>a</sup>	15.20±0.10 <sup>ab</sup>	196.04±1.49 <sup>ab</sup>	52.96±1.93 <sup>b</sup>	54.95±0.28 <sup>a</sup>	24.54±0.49 <sup>a</sup>	60.18±0.35 <sup>a</sup>	0.41±0.01 <sup>a</sup>	7.06±0.87 <sup>a</sup>

#Means followed by the same letters in the same columns do not differ by Tukey's test at 5% probability; L\*: lightness; a\*: redness/greenness; b\*: yellowness/ blueness; C\*: chroma; h\*: hue angle; ΔE\*<sub>ab</sub>: color difference.



### 3.5.2. *pH and total acidity*

For pH and total acidity, when the juice extraction was performed using Pectinex® Ultra Clear (PUC or PUC/LB), the pH decreased (with an increase in acidity), which can be explained by the high content of PME in this enzyme preparation. The de-esterification of methoxyl groups of pectin by PME leaves carboxyl groups free on the pectin backbone (Jayani et al., 2005; Tapre & Jain, 2014), favoring the increase in juice acidity. For the juice treated only with LB, it was not observed any significant differences from the control treatment.

### 3.5.3. *Soluble solids (°Brix) and reducing sugars*

Higher values of soluble solids and reducing sugars were obtained when Lallzyme® Beta was used (LB or PUC/LB). It can be explained by the high content of cellulase enzymes in this preparation. Cellulases can be classified according to the attack position on the substrate as endoglucanases that catalyze the hydrolysis of internal linkages  $\beta$ -1,4 of the cellulose, exoglucanases which act on the ends of the cellulose chain releasing glucose or cellobiose units, and  $\beta$ -glycosidases which hydrolyze cellobiose, these enzymes work synergistically to release glucose units (Arantes & Saddler, 2010), increasing the content of soluble solids in the juice.

### 3.5.4. *Color juice*

Regarding the color parameters, the lowest color intensity was for the juice in the control treatment. The highest values for  $L^*$  (whiteness) were obtained by the control treatment. For  $a^*$  (redness) and  $b^*$  (blueness) parameters, the treatment with the mixture of enzymes (PUC/LB) provided the highest values. The overall increase of these two variables

leads to a greater Chroma ( $C^*$ ) for juice produced using the mixture of enzymes. This juice also showed the greatest color difference in comparison with the control treatment.

### 3.5.5. Phenolic compounds

The identification and quantification of different phenolic compounds were performed by HPLC-DAD-MS. Based on the combined information obtained from chromatographic elution on C18 column, UV-vis and mass spectra characteristics, twenty three phenolic compounds were identified (Fig. 3 and Table 6). The MS<sup>2</sup> fragments characteristic of the chemical structure and functional groups allowed the confirmation of the assigned protonated and deprotonated molecules. All treatments showed similar profile of phenolic compounds, although differences regarding the concentration of the compounds were observed (Table 7).

Among the identified phenolic compounds, 14 were anthocyanins. The total anthocyanin concentration ranged from 38.40 mg.L<sup>-1</sup> to 54.23 mg.L<sup>-1</sup>. The highest concentration was for the treatment with PUC/LB, while the lowest was for the control treatment. Compared to the control treatment, all the treatments using enzymes increased the concentration of anthocyanins, 40.8 %, 26.5 % and 21.1 %, respectively for PUC/LB, LB and PUC.

The major anthocyanin found in grape juice was malvidin-3,5-diglycoside (up to 15.50 mg.L<sup>-1</sup>), being followed by cyanidin-3-O-glucoside (up to 10.55 mg.L<sup>-1</sup>). In grapes, anthocyanins constitute a large percentage of phenolic compounds, representing an important compound for the production of juices, contributing to the sensory attributes, and mainly for the coloring of juices (Muñoz-Espada, Wood, Bordelon, & Watkins, 2004). Moreover, the anthocyanins presents several beneficial properties, such as antioxidant, cardioprotective, anticancer, anti-inflammation, antiaging and antimicrobial activities (Xia, Deng, Guo, & Li, 2010).

Figure 3. HPLC chromatograms of phenolics compounds in grape juice. Peak identification: 1. Galloyl-O-glucoside, 2. Gallic acid, 3. Feruloyl di-hexoside, 4. Feruloyl di-hexoside, 5. 2-S-glutathionylcaftaric acid, 6. Cyanidin-3,5-O-diglucoside, 7. Malvidin-3,5-O-diglucoside, 8. *p*-coumaric acid glucoside, 9. Cyanidin-3-O-glucoside, 10. Petunidin 3-O-glucoside, 11. Feruloyl O-hexoside, 12. Caftaric acid, 13. Peonidin-3-O-glucoside, 14. Malvidin-3-O-glucoside, 15. Fertaric acid, 16. Delfinidin 3-O-6-O-(acetyl)glucoside Cyanidin-3-O-6-O-(acetyl)glucoside, 17. Delfinidin-3-(6-O-*p*-coumaryl),5-O-diglucoside, 18. Cyanidin-3-(6-O-*p*-coumaryl),5-O-diglucoside, 19. Peonidin-3-(6-O-*p*-coumaryl),5-O-diglucoside, 20. Quercetin-3-O-glucoside, 21. Delfinidin-3-O-(6-O-*p*-coumaryl)glucoside, 22. Cyanidin-3-(6-O-*p*-coumaryl)glucoside, 23. Malvidin-3-O-(6-O-*p*-coumaryl)glucoside.

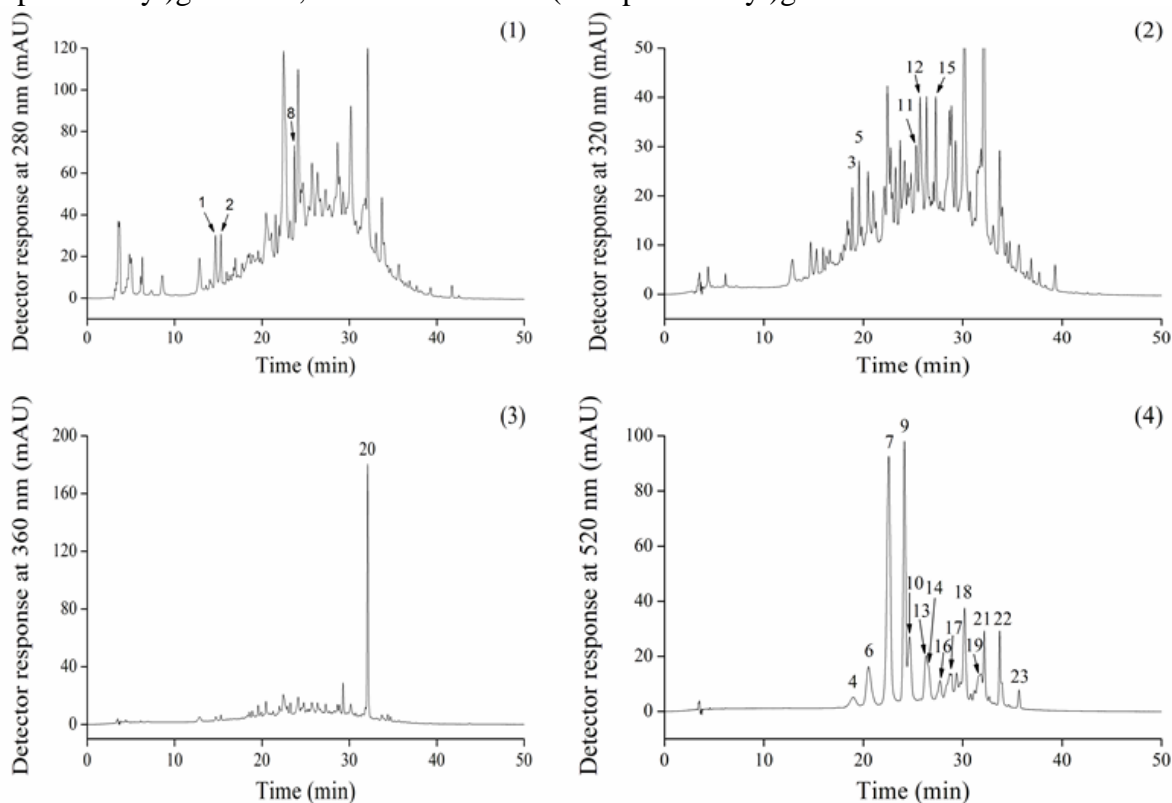


Table 6. Chromatographic, UV–Vis, and Mass Spectroscopy Characteristics of phenolic compounds in grape juice, obtained by HPLC–DAD–MS.

Peak <sup>a</sup>	Tr <sup>b</sup> (min)	λ <sub>max</sub> <sup>c</sup> (nm)	Exact mass	[M+H] <sup>+</sup>	MS <sup>2</sup> (+)	[M-H] <sup>-</sup>	MS <sup>2</sup> (-)	Compounds
1	14.9	277	332.0743	ND	ND	331.0842	124.0287/169.0336	Galloyl-O-glucoside
2	15.4	292	170.0215	ND	ND	169.0348	124.0281	Gallic acid
3	18.9	325	518.1635	ND	ND	517.1800	193.0372/355.1085	Feruloyl di-hexoside
4	19.0	276/519	627.1561	627.1647	303.0503/465.1027	ND	ND	Delfinidin 3,5-diglucoside
5	19.6	323	617.1162	618.1299	145.0616/264.0349/543.1010	616.1795	149.0264/167.0374/211.0320/272.1208/466.1455	2-S-glutathionylcaftaric acid
6	20.5	277/516	611.1612	611.1667	287.0577/449.1175	ND	ND	Cyanidin-3,5-O-diglucoside
7	22.6	277/522	655.1874	655.1868	331.0840/493.1439	ND	ND	Malvidin-3,5-O-diglucoside
8	23.7	281	326.1001	ND	ND	325.1310	119.0638/163.0583	<i>p</i> -coumaric acid glucoside
9	24.2	279/516	449.1084	449.1120	287.0571	447.1569	285.0773	Cyanidin-3-O-glucoside
10	24.7	279/525	479.1189	479.1239	317.0670	477.1591	315.0879	Petunidin 3-O-glucoside
11	25.3	326	356.1107	ND	ND	355.1085	193.0372/355.1085	Feruloyl O-hexoside
12	25.7	320	312.0481	ND	ND	311.0722	135.0601/149.0225/179.0534	Caftaric acid
13	26.3	280/518	463.1240	463.1277	301.0723	461.1612	285.0723	Peonidin-3-O-glucoside
14	26.5	279/525	493.1346	493.1370	331.0844	491.1773	329.0973	Malvidin-3-O-glucoside
15	27.3	323	326.0637	ND	ND	325.0900	134.0510/149.0770/178.0480/193.0795	Fertaric Acid
16	27.7	279/525	507.1138	507.1156	303.0506	505.1575	301.0606	Delfinidin 3-O-6-O-(acetyl)glucoside
17	28.7	280/528	773.1929	773.2008	303.0505/465.1061/637.0756	ND	ND	Delfinidin-3-(6-O- <i>p</i> -coumaryl),5-O-diglucoside
18	30.2	281/523	757.1979	757.2044	287.0569/449.1111/595.1484	755.2698	285.0738/447.1459/593.1976	Cyanidin-3-(6-O- <i>p</i> -coumaryl),5-O-diglucoside
19	31.8	280/524	771.2136	771.2117	301.0731/463.1201/609.1650	ND	ND	Peonidin-3-(6-O- <i>p</i> -coumaroyl),5-O-diglucoside
20	32.1	352	464.0955	465.1087	303.0513	463.1402	271.00589/300.0625	Quercetin-3-O-glucoside
21	32.2	281/528	611.1400	611.1440	303.0508	609.1917	301.0621	Delfinidin-3-O-(6-O- <i>p</i> -coumaryl)glucoside
22	33.7	282/523	595.1451	595.1488	287.0555	593.1978	285.0753	Cyanidin-3-(6-O- <i>p</i> -coumaryl)glucoside
23	35.7	281/528	639.1713	639.1782	331.0833	637.2214	329.1023	Malvidin-3-O-(6-O- <i>p</i> -coumaryl)glucoside

<sup>a</sup>Numbered according to the chromatograms shown in Figure S2; <sup>b</sup>Retention time on the C18 column; <sup>c</sup>Maximum absorbance; <sup>d</sup>Not detected.

Regarding the phenolic acids, the total concentration ranged from 23.89 mg.L<sup>-1</sup> to 28.80 mg.L<sup>-1</sup> for the control and PUC/LB treatments, respectively. Among the phenolic acids, the gallic acid can be highlighted as the main phenolic acid found in the juice (4.95 to 5.80 mg.L<sup>-1</sup>). As well as anthocyanins, the PUC/LB treatment provided the highest extraction of phenolic acids. Mudnic et al. (2010) reported the importance of phenolic acid in antioxidant activity, being the gallic acid the one that more contributes to antioxidant activity. In comparison with the control, the enzymatic treatments provided an increase of 20.55 %, and 15.75 % 6.43% in total phenolic acids, respectively, for PUC/LB, LB and PUC.

With respect to flavonoids, quercetin-3-O-glucoside was the main flavonoid found in the juice, ranging from 15.75 mg.L<sup>-1</sup> to 30.84 mg.L<sup>-1</sup>. The highest concentration was obtained by treatment with PUC/LB, while lowest concentrations were obtained by the control treatment. Compared to the control, the treatments with PUC/LB, LB and PUC provided an increase of 111.9%, 86.5% and 61.4% on the flavonoids contents, respectively. This increase in the content of quercetin-3-O-glucoside may reflect on the beneficial properties of grape juice, since quercetin is one of the most effective antioxidant flavonoids (Bonilla, Mayen, Merida, & Medina, 1999). Some studies showed an inverse relation between quercetin rich diets and the risk of cardiovascular diseases and regulation of cancer promoter genes (Castilla et al., 2006; Xia et al., 2010).

In general, Lallzyme® Beta provided higher phenolic compounds extraction than Pectinex® Ultra Clear, when used individually. This fact can be explained by the higher content of cellulases presents in LB, as mentioned before. However, when they were used in combination, the extraction of phenolic compounds was intensified. The complexity of pectinolytic enzymes from Pectinex® Ultra Clear allowed better hydrolysis of the pectic complex in the middle lamella, facilitating the access of cellulases from Lallzyme® Beta in

the cell wall of the grape cells. The combined action of these two enzymes on different polysaccharides of the vegetable cell wall possibly led to a more extension of cell wall degradation and, consequently, to the improved release of phenolic compounds.

Table 7. Phenolic compounds concentration in the grape juice extracted by different enzymatic treatments.

Compounds	Ret. Time (min)	$\lambda$ max (nm)	Treatments			
			Control	PUC	LB	PUC/LB
Galloyl-O-glucoside	14.9	277	4.83 <sup>a</sup>	5.07	5.48	5.66
Gallic acid	15.4	292	4.95 <sup>a</sup>	5.40	5.76	5.80
Feruloyl di-hexoside	18.9	325	0.82 <sup>b</sup>	0.96	1.06	1.16
Delfinidin 3,5-diglucoside	19.0	276/519	0.98 <sup>c</sup>	1.26	1.38	1.62
2-S-glutathionylcaftaric acid	19.6	323	1.20 <sup>b</sup>	1.43	1.78	2.11
Cianidin 3,5-diglucoside	20.5	277/516	2.65 <sup>c</sup>	3.45	4.03	4.56
Malvidin 3,5-diglucoside	22.6	277/522	14.70 <sup>c</sup>	17.91	18.66	21.81
<i>p</i> -coumaric acid glucoside	23.7	2801/ 312	3.77 <sup>d</sup>	3.60	3.77	3.79
Cianidin 3-O-glucoside	24.2	279/516	8.47 <sup>c</sup>	11.80	12.96	14.76
Petunidin 3-O-glucoside	24.7	279/525	3.57 <sup>c</sup>	4.55	4.11	5.03
Feruloyl O-hexoside	25.3	281/326	1.94 <sup>b</sup>	1.90	2.39	2.49
Caftaric acid	25.7	320	4.22 <sup>b</sup>	4.81	4.86	5.30
Peonidin 3-O-glucoside	26.3	280/518	1.89 <sup>c</sup>	2.39	2.34	2.72
Malvidin 3-O-glucoside	26.5	279/525	1.52 <sup>c</sup>	1.84	1.67	1.93
Fertaric acid	27.3	323	2.16 <sup>b</sup>	2.25	2.55	2.49
Delfinidin 3-O-6-O-(acetyl)glucoside	27.7	279/525	0.99 <sup>c</sup>	1.13	1.06	1.36
Delfinidin-3-(6-O- <i>p</i> -coumaryl),5-O-diglucoside	28.7	280/528	2.27 <sup>c</sup>	2.70	2.92	2.76
Cianidin-3-(6-O- <i>p</i> -coumaryl),5-O-diglucoside	30.2	281/523	5.85 <sup>c</sup>	6.05	6.76	6.67
Peonidin-3-(6-O- <i>p</i> -coumaryl),5-O-diglucoside	31.8	280/524	2.71 <sup>c</sup>	3.03	3.22	3.21
Quercetin-3-Oglucoside	32.1	352	15.75 <sup>e</sup>	24.04	27.42	30.84
Delfinidin-3-O-(6-O- <i>p</i> -coumaryl)glucoside	32.2	281/528	2.15 <sup>c</sup>	2.44	2.70	2.76
Cianidin-3-O-(6-O- <i>p</i> -coumaryl)glucoside	33.7	282/523	2.64 <sup>c</sup>	3.32	2.89	3.36
Malvidin-3-O-(6-O- <i>p</i> -coumaryl)glucoside	35.7	281/528	0.50 <sup>c</sup>	0.53	0.62	0.62
Total anthocyanins (mg.L <sup>-1</sup> )			38.40	46.56	48.64	54.22
Total phenolic acids (mg.L <sup>-1</sup> )			23.89	25.43	27.65	28.80

<sup>a</sup>Quantified in Gallic acid (mg.L<sup>-1</sup>); <sup>b</sup>Quantified in Ferulic acid (mg.L<sup>-1</sup>); <sup>c</sup>Quantified in Cyanidin (mg.L<sup>-1</sup>); <sup>d</sup>Quantified in Coumaric acid (mg.L<sup>-1</sup>); <sup>e</sup>Quantified in Quercetin (mg.L<sup>-1</sup>).

### 3.5.6. Antioxidant capacity

Antioxidant capacity was analyzed by ABTS and reducing capacity. The results varied from 30.55 mM to 36.06 mM of Trolox and 899 mg.L<sup>-1</sup> to 1140 mg.L<sup>-1</sup> of gallic acid,

respectively (Table 8). The highest antioxidant capacity was also obtained by the PUC/LB treatment. Thus, the treatment that allowed the higher extraction of phenolic compounds was the treatment that provided the highest antioxidant capacity. These findings are also in agreement with Lima et al. (2014), who observed that the antioxidant capacity values increased with the increase of enzyme concentration and temperature, possibly due to the higher extraction of antioxidant phenolic compounds.

Table 8. Analysis of antioxidant capacity of the juices treated with different enzymatic treatments.

Enzyme preparation	Reducing capacity (mg.L <sup>-1</sup> )	ABTS (mM)
Control	849±22 <sup>c*</sup>	30.55±0.51 <sup>c</sup>
PUC	923±58 <sup>bc</sup>	32.47±0.89 <sup>bc</sup>
LB	1006±33 <sup>ab</sup>	33.80±1.14 <sup>ab</sup>
PUC/LB (ratio = 0.52)	1090±67 <sup>a</sup>	36.03±1.58 <sup>a</sup>

\*Means followed by the same letters in the same columns do not differ by Tukey's test at 5% probability.

#### 4. Conclusions

Nowadays, the consumers are concerned to buy a product with healthy characteristics, thus, it is important for food industries to improve their products quality, as well as their yield. Thus, in this work, it was demonstrated that the mix of two different enzymatic preparations was able to improve the juice yield and bioactive compounds extraction when compared to each preparation individually. The best conditions for extraction of grape juice from variety Concord was using a mixture of Pectinex® Ultra Clear, containing high pectinolytic activity, and Lallzyme® Beta, containing high cellulolytic activity. Moreover, it was shown that, as important as the use of enzymes for juice extraction, is the suitable choice of enzymatic preparation and the extraction conditions.

## Acknowledgments

This work was supported by grants and scholarships (L Dal Magro, L Dalagnol) from FAPERGS, CNPq (process 403505/2013-5), and CAPES. The authors wish to thank Mr. Ramiro Martínez (Novozymes, Spain) and LNF Latinoamericana for kindly supplying the enzymes used in this research, as well as Vitivinicola Jolimont (Canela, Brazil) for providing the grapes.

## References

- Albershein, P. (1966). Pectin lyase from fungi. *Methods in Enzymology*, 8, 628–631.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J., & Serra, J. L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 33, 21-28.
- Arantes, V., & Saddler, J. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, 3, 1-11.
- Bautista-Ortín, A. B., Martínez-Cutillas, A., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2005). Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. *International Journal of Food Science & Technology*, 40, 867-878.
- Bonilla, F., Mayen, M., Merida, J., & Medina, M. (1999). Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chemistry*, 66, 209-215.
- Cabrera, S. G., Jang, J. H., Kim, S. T., Lee, Y. R., Lee, H. J., Chung, H. S., et al. (2009). Effects of processing time and temperature on the quality components of Campbell grape juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33, 347-360.
- Capanoglu, E., Vos, R. C. H. d., Hall, R. D., Boyacioglu, D., & Beekwilder, J. (2013). Changes in polyphenol content during production of grape juice concentrate. *Food Chemistry*, 139, 521-526.
- Castilla, P., Echarri, R., Dávalos, A., Cerrato, F., Ortega, H., Teruel, J. L., et al. (2006). Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84, 252-262.
- Dal Magro, L., Goetze, D., Ribeiro, C., Paludo, N., Rodrigues, E., Hertz, P., et al. (2016). Identification of Bioactive Compounds From *Vitis labrusca* L. Variety Concord Grape Juice Treated With Commercial Enzymes: Improved Yield and Quality Parameters. *Food and Bioprocess Technology*, 9, 365-377.



Demir, N., Acar, J., Sarioğlu, K., & Mutlu, M. (2001). The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment. *Journal of Food Engineering*, *47*, 275-280.

Ghose, T. K. (1987). Measurement of Cellulase Activities. *Pure and Applied Chemistry*, *59*, 257-268.

Jayani, R. S., Saxena, S., & Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, *40*, 2931-2944.

Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., & Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, *77*, 215-227.

Khandare, V., Walia, S., Singh, M., & Kaur, C. (2011). Black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus*) juice: Processing effects on antioxidant composition and color. *Food and Bioprocess Processing*, *89*, 482-486.

Lima, M. d. S., Silani, I. d. S. V., Toaldo, I. M., Corrêa, L. C., Biasoto, A. C. T., Pereira, G. E., et al. (2014). Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. *Food Chemistry*, *161*, 94-103.

Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, *31*, 426-428.

Morris, J. R., & Striegler, K. (1996). Grape juice: factors that influence quality, processing technology and economics. In L. Somogyi (Ed.), *Fruits: major processed products* (pp. 328-348). Lancaster, PA.: Technomic Publishing Company.

Mudnic, I., Modun, D., Rastija, V., Vukovic, J., Brizic, I., Katalinic, V., et al. (2010). Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. *Food Chemistry*, *119*, 1205-1210.

Muñoz-Espada, A. C., Wood, K. V., Bordelon, B., & Watkins, B. A. (2004). Anthocyanin Quantification and Radical Scavenging Capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch Grapes and Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 6779-6786.

Pinelo, M., Arnous, A., & Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, *17*, 579-590.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*, 1231-1237.

Rodrigues, E., Mariutti, L. R. B., & Mercadante, A. Z. (2013). Carotenoids and Phenolic Compounds from *Solanum sessiliflorum*, an Unexploited Amazonian Fruit, and Their

Scavenging Capacities against Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 3022-3029.

Romero-Cascales, I., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2012). The effect of a commercial pectolytic enzyme on grape skin cell wall degradation and colour evolution during the maceration process. *Food Chemistry*, 130, 626-631.

Rouse, A. H., & Atkins, C. D. (1952). Heat inactivation of pectinesterase in citrus juices. *Food Technology*, 6, 291-294.

Singleton, V. L., & Esau, P. (1969). Phenolic substances in grapes and wine, and their significance. *Advances in Food Research. Supplement.*, 1, 1-261.

Stalmach, A., Edwards, C. A., Wightman, J. D., & Crozier, A. (2011). Identification of (Poly)phenolic Compounds in Concord Grape Juice and Their Metabolites in Human Plasma and Urine after Juice Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 9512-9522.

Tapre, A. R., & Jain, R. K. (2014). Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. *International Food Research Journal*, 21, 447-453.

Xia, E. Q., Deng, G. F., Guo, Y. J., & Li, H. B. (2010). Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 622-646.

## **CAPITULO 5 - Preparation and characterization of combi-CLEAs from pectinases and cellulases: a potential biocatalyst for grape juice clarification**

Neste trabalho estudou-se a produção, caracterização e aplicação dos combi-CLEAs para clarificação do suco de uva. Os combi-CLEAs foram preparados através da precipitação de um preparado enzimático comercial composto por populações heterogêneas de enzimas. Para a preparação dos CLEAs, um delineamento experimental de composto central (CCD) e a metodologia de superfície de resposta (RSM) foram usados para avaliar as variáveis: concentração de glutaraldeído e tempo de reação. O glutaraldeído foi utilizado como agente entrecruzante, quatro agentes precipitantes foram testados e o efeito da adição de albumina de soro bovino (BSA) foi avaliado. Finalmente, a enzima solúvel, os combi-CLEAs e os combi-CLEAs-BSA foram caracterizados em relação as suas atividades enzimáticas, pHs e temperaturas ótimas, estabilidade térmica e ao pH, estabilidade operacional e na clarificação do suco de uva. Os resultados estão apresentados no manuscrito a seguir, publicado na revista *RSC Advances*, v. 6, p. 27242-27251, 2016.

## **Preparation and characterization of a Combi-CLEAs from pectinases and cellulases: a potential biocatalyst for grape juice clarification**

Lucas Dal Magro<sup>1</sup>, Plinho F. Hertz<sup>1</sup>, Roberto Fernandez-Lafuente<sup>2</sup>, Manuela P. Klein<sup>1,3</sup>,

Rafael C. Rodrigues<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology, Bioprocess and Biocatalysis Group, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Biocatalisis. ICP-CSIC. Campus UAM-CSIC. Cantoblanco. 28049 Madrid. Spain

<sup>3</sup>Department of Bioprocesses, State University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

\* Corresponding author:

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

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

## Abstract

Combined cross-linked enzyme aggregates (combi-CLEAs) are a novel prospective for immobilization of mixture of enzymes and the present study addresses the preparation, characterization and application of pectinases-cellulases combi-CLEAs for grape juice clarification. Initially, 8 enzymatic preparations were tested for turbidity reduction in grape juice and Rohapect® 10L provided the best results (around 50 % in 1 h) being selected for CLEA preparation. The optimization of combi-CLEAs, was performed using a central composite design (CCD) and response surface methodology (RSM) varying the glutaraldehyde concentration and reaction time, using iso-propanol as precipitant agent. The best conditions for Rohapect® 10L CLEAs preparation was 110 mM of glutaraldehyde and 2 h. Bovine serum albumin (BSA) was used as feeder and improved the volumetric activity, recovered activity and thermal stability. Combi-CLEAs-BSA prepared using 0.4 mg.mL<sup>-1</sup> of enzyme mixture and 2.4 mg.mL<sup>-1</sup> of BSA presented an activity of 14 U.mL<sup>-1</sup>, 18 % of recovered activity and 3-times more thermal stability compared to soluble enzymes. The combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA were tested in repeated batches, being reused for 4 and 6 cycles, respectively, keeping 100 % of the initial activity. The combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA appear to be suitable alternatives of immobilized biocatalyst for the clarification of grape juices.

**Keywords:** pectinase; cellulase; cross-linked enzyme aggregates; bovine serum albumin; grape juice clarification.

## 1. Introduction

In the processing of grape juice, pressing the fruit leads to a disruption of the cell walls, releasing the internal juice. This method may generate some problems such as excessive viscosity and turbidity by the formation of insoluble particles which may hinder processing and decrease the quality of the juice.<sup>1</sup> This turbidity can be found in fruit juices in different degrees, mainly due to the presence of polysaccharides (pectin, cellulose, hemicellulose, lignin and starch).<sup>2,3</sup> In order to overcome these problems, pectinases, cellulases and other depolymerizing enzymes are extensively applied in fruit juice processing, since they promote the hydrolysis of such compounds, improving filtration, clarification and stabilization of the final product. Moreover, a greater extraction of compounds responsible for the color of the juices can be achieved.<sup>4-7</sup> The utilized enzymes are already commercialized as mixtures of cellulases, hemicellulases and pectinases to hydrolyze a wide range of polysaccharides.

Depolymerizing enzymes in their immobilized form have already been used for the clarification of apple, orange and carrot juice.<sup>8-10</sup> The great advantage of using immobilized enzymes is the easy separation and multiple reuses that make them commercially and industrially feasible.<sup>11,12</sup> In addition, a proper immobilization may cause an improved thermal and operational stability of the resultant biocatalyst (by increasing the enzyme rigidity or avoiding enzyme subunit dissociation),<sup>13</sup> allowing their uses at more drastic conditions than their soluble counterparts.<sup>14-16</sup> On the other hand, immobilization on a pre-existing solid has a certain cost, including the process and the support.<sup>11</sup> Then, the large amount of non-catalytic mass "dilutes" the effective enzyme, leading to a low specific activity of the full biocatalyst.<sup>17</sup> In contrast, cross-linked enzymes results in both stabilization and immobilization, without a solid support, becoming a simple, rapid and economical process.<sup>17-19</sup>

Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) are prepared by precipitating the target

enzyme with the addition of specific precipitant agents such as organic solvents, non-ionic polymers or inorganic salts followed by cross-linking with a bifunctional reagent.<sup>11,18,20</sup> The precipitant agents provide the physical aggregation of enzyme molecules into supermolecular structures, in some instances without perturbation of the original three-dimensional structure of the protein. These solid aggregates are held together by noncovalent linkages and readily collapse and re-dissolve when the precipitant is eliminated and the aggregates are dispersed in the aqueous medium. Thus, a cross-linking step is necessary to stabilize the aggregates by covalent bonds, avoiding the solubilization of the protein when removing the precipitating reagent, rendering them permanently insoluble.<sup>17,21-23</sup> It can be also prepared the named combi-CLEAs by co-precipitation of two or more different enzymes. This may be a solution in the case of cascade reactions or if the catalyst must attack several substrates by different enzymes. Moreover, using these mixtures of enzymes with different sizes, immobilization on pre-existing supports may be a problem, because the protein with the largest size will determine the support pore diameter, which will control the final specific area. Nevertheless, this problem can be avoided using CLEAs.<sup>11,24</sup>

The cross-linking agent has very crucial role for the final activity and stability of CLEAs. Generally, glutaraldehyde has been extensively used because of its low cost, ease of handling and the ability to form covalent bonds with numerous enzymes.<sup>25</sup> However, when dealing with enzymes with low amino groups in their surfaces,<sup>26</sup> low protein concentration in the preparation,<sup>27</sup> or if the enzyme activity is vulnerable to the modification with glutaraldehyde,<sup>28</sup> the cross-linking might not be effective, resulting in CLEAs with low mechanical stability and/or low catalytic activity. The addition of bovine serum albumin (BSA) as proteic feeder makes easier the CLEAs preparation due to the large number of amine groups present in this protein.<sup>27,29</sup>

CLEAs optimization preparation is a quite complex and time-consuming process. Any

factor that may alter the protein precipitation or the aggregate cross-linking may affect the particle size, and activity recovery.<sup>30</sup> The use of response surface methodology (RSM) for optimizing this complex process may be a potential tool to optimize it.<sup>20</sup>

Based on these aspects, the objective of the present work was to optimize the preparation of pectinases-cellulases combi-CLEAs for the application on the grape juice clarification. Firstly, the influence of four precipitant agents was evaluated considering the enzyme activity recovery. For combi-CLEAs preparation, a central composite design (CCD) and response surface methodology (RSM) were used to evaluate the glutaraldehyde concentration and reaction time. The effect of the enzyme and BSA concentrations on recovered activity were also investigated. Finally, the soluble enzymes, combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA were characterized and their enzymatic activities, optimal pH and temperature, thermal and pH stability, operational stability and juice clarification were compared. The commercial preparations used are a mixture of several enzymes, mainly pectinases and cellulases that need to be used in combination for juice clarification, making complex the analysis of individual CLEAs.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Materials**

Raw grape juice, after pressing and without any treatment, was kindly donated by Vitivinícola Jolimont (Canela, RS, Brazil). Pectinex® Ultra SP-L, Pectinex® Ultra Color, Pectinex® Smash XXL, Novozym® 33095, Pectinex® Ultra Clear, Pectinex® BE XXL were acquired from Novozymes (Spain), Rohapect® 10L was acquired from Amazon group (Brazil) and Lallzyme® Beta was acquired from Lallemand Wine (France). Pectin from apple, polygalacturonic acid, galacturonic acid and bovine serum albumin were from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). All other reagents and solvents were of analytical grade.



## 2.2. Determination of enzyme activities

The enzymatic activities of cellulase (CE) and total pectinase (PE), as well as polygalacturonase (PG), pectinlyase (PL) and pectin methyl esterase (PME) activities, were performed as described by Dal Magro *et al.*<sup>31</sup>

## 2.3. Grape juice clarification

The commercial preparations were standardized by total pectinase activity to allow a better comparison among them. Then, 5 U of total pectinase was added to 1 mL of raw grape juice, and incubated at 40 °C for 1 h. After, percentage of turbidity reduction was measured, considering 100 % the juice without any enzymatic treatment. Turbidity was measured by scattered light at 860 nm (spectrophotometrically), as proposed by Anderson,<sup>32</sup> with modifications.

## 2.4. Screening of precipitant agents

Four organic solvents (acetone, ethanol, isopropyl alcohol and tert-butanol) were evaluated in the residual enzymatic activity. For this, 0.1 mL of the diluted enzyme was added to 0.9 mL of the organic solvent. The mixture was homogenized in a roller mixer during 4 h, at 20 °C. Afterwards, the precipitated enzyme was recovered by centrifugation ( $3000 \times g$ , 5 min) and resuspended in 50 mM sodium citrate buffer, pH 4.8 and the total pectinase activity was measured as described.

## 2.5. Combi-CLEA preparation

For the combi-CLEA preparation, the commercial enzymatic preparation was diluted in sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.8). Then, 0.1 mL of the diluted enzyme ( $0.3 \text{ mg.mL}^{-1}$ )

was added to 0.9 mL of isopropyl alcohol, and homogenized in a roller mixer at room temperature. The concentration of glutaraldehyde and reaction time, which means the contact time between enzyme and glutaraldehyde solution, were defined by the experimental design. A central composite design (CCD) with two variables varying at five levels was carried out in order to obtain the optimal conditions for combi-CLEA preparation. Glutaraldehyde concentration varied from 20 to 200 mM while reaction time from 2 to 16 h. The factorial design consisted of four factorial points, four axial points (two axial points on the axis of design variable), and three replicates at the central point, leading to 11 experiments, as shown in Table 1. The combi-CLEA were recovered by centrifugation ( $3000 \times g$ , 5 min), the supernatant was removed and the combi-CLEA were washed 3-times with sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.8) to ensure the elimination of all free enzyme and residual glutaraldehyde. Finally, the combi-CLEA were suspended in 1 mL of sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.8), and stored at 4 °C. For each experiment recovered activity was calculated as follows:

$$\text{RA (\%)} = \frac{\text{Total pectinase activity in CLEAs (U)}}{\text{Initial pectinase activity (U)}} \times 100 \quad (1)$$

## 2.6. Effect of enzyme concentration

The enzyme concentration (0.1 to 1.0 mg.mL<sup>-1</sup>) was evaluated in order to improve residual activity of the resulting combi-CLEAs. Then, 0.1 mL of the proper diluted enzyme was added to 0.9 mL of isopropyl alcohol and glutaraldehyde (110 mM final concentration). The mixture was homogenized in a roller mixer during 2 h, at room temperature ( $\pm 20$  °C). Afterwards, combi-CLEA were recovered, washed and stored as described above.

## 2.7. Effect of BSA as protein feeder

Combi-CLEA-BSA preparation was performed as described in section 2.6, with the addition of different concentrations of BSA ranging from 0.2 to 5.0 mg.mL<sup>-1</sup>.

## 2.8. Thermal and pH stabilities

The thermal stabilities of the soluble enzyme, combi-CLEA and combi-CLEA-BSA were performed by incubating the enzyme in sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.8) at 50 °C. The pH stability was performed by incubating the preparations in sodium citrate buffer (50 mM, pH 3.5), at 4 °C. Periodically, samples were withdrawn and the total pectinase activity was measured.

The thermal inactivation was described by a first order reaction:

$$\frac{A}{A_0} = \exp(-kt) \quad (2)$$

where  $A$  is the enzyme activity at time  $t$ ,  $A_0$  the initial enzyme activity,  $t$  is the treatment time, and  $k$  is the constant inactivation rate at the studied temperature. The half-life ( $t_{1/2}$ ) was calculated from the values of  $k$ , following this equation:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (3)$$

## 2.9. Optimal pH and temperature

Soluble enzyme, combi-CLEA and combi-CLEA-BSA were analyzed and compared with respect to their optimal pH and temperature conditions. A central composite design (CCD) with two variables varying at five levels was carried out in order to obtain the optimal conditions for enzymatic activity. Temperature (30 – 70 °C) and pH (3.0 – 6.0) were evaluated. The sets of experiments for each enzyme are shown in the Table 2.

## 2.10. Operational stability

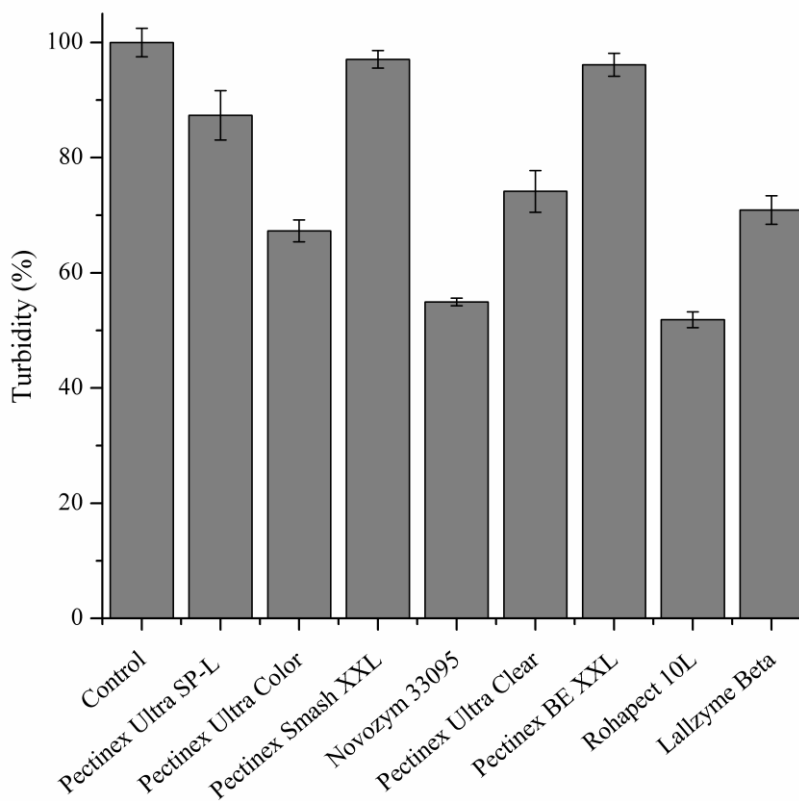
Operational stability of combi-CLEA and combi-CLEA-BSA was carried out by pectin hydrolysis. 2 U of total pectinase of the combi-CLEA or combi-CLEA-BSA was added to 1.0 mL of substrate ( $1 \text{ g.L}^{-1}$  of pectin) prepared in sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.8), and incubated at 37 °C during 15 min, under agitation. Combi-CLEA and combi-CLEA-BSA were recovered from the reaction mixture by centrifugation ( $3000 \times g$ , 5 min) and subsequently washed with sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.8), before addition of fresh substrate for a new cycle. The concentration of product formed after each cycle was determined by the DNS method according to Miller,<sup>33</sup> considering the concentration of the first cycle as 100 %.

## 3. Results and discussion

### 3.1 Screening of enzymatic preparations for grape juice clarification

Before combi-CLEAs preparation, it was performed a test of the clarification potential of eight commercial enzyme preparations in grape juice. Among all commercial enzyme preparations tested, Novozym® 33095 and Rohapect® 10L provided the best clarifications in the grape juices, promoting a turbidity reduction of 45.1% and 48.2%, respectively, compared with the untreated juice (Figure 1). Rohapect® 10L has a very complex composition with high specific activities, as can be seen in Dal Magro *et al.*,<sup>31</sup> which is important aiming to CLEAs preparation. Thus, this preparation was select for the next experiments.

Figure 1. Turbidity of the grape juice after treatment with eight different commercial enzymatic preparations. The measurements were performed in triplicate and the error bar represents the percentage error.



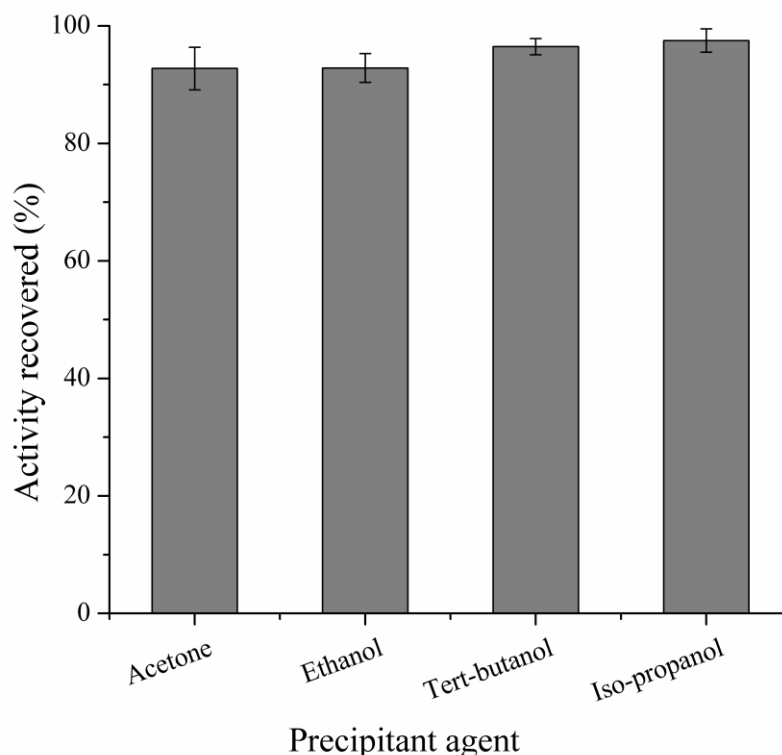
### 3.2. Screening of organic solvents for combi-CLEAs preparation

The precipitation is an important step in the combi-CLEAs preparation, because in this step the soluble enzyme becomes an insoluble aggregate. An efficient precipitation of all enzymes in its active form is a key to achieve high enzymatic activity of CLEAs, and it depends largely on the nature of the precipitant used.<sup>23</sup> After choosing the enzymatic preparation, the effect of acetone, ethanol, isopropyl alcohol and tert-butanol as precipitant agents were analyzed.

As can be seen in Fig. 2, all precipitant agents provided satisfactory recovered activity (RA) after resuspension. However, precipitation with tert-butanol and isopropyl alcohol presented higher RA, of 96.4 % and 97.5 %, respectively. Saturated ammonium sulfate was

tested and the recovered activity was very low (data not shown). Then, the isopropyl alcohol was chosen as precipitant agent for further combi-CLEAs preparation.

Figure 2. Effect of acetone, ethanol, tert-butanol and isopropyl alcohol as precipitant agents. The measurements were performed in triplicate and the error bar represents the percentage error.

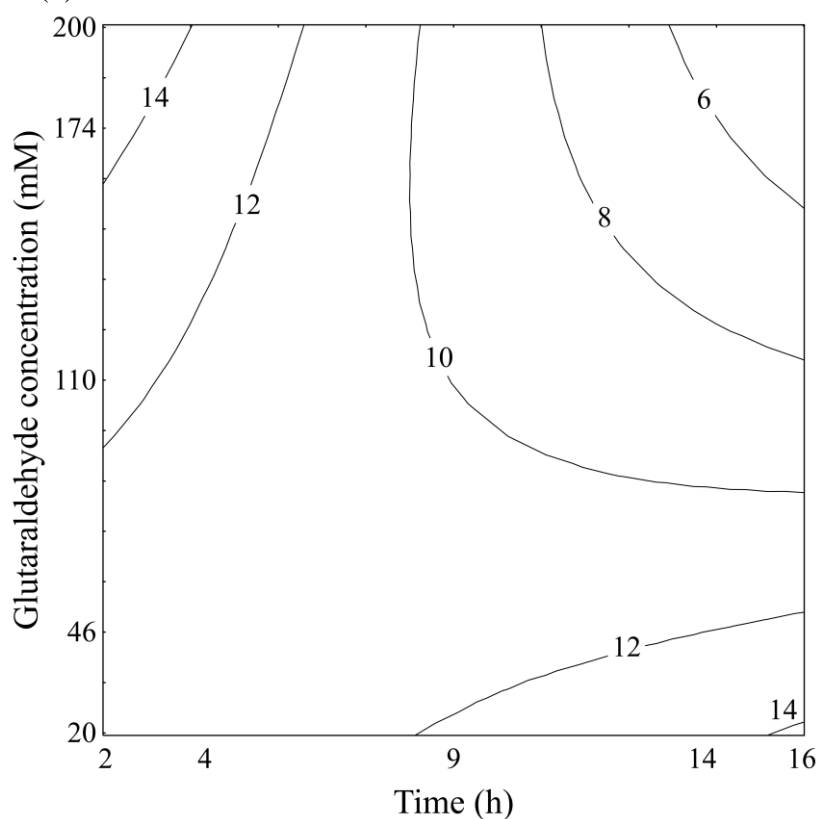


### 3.3. Optimal conditions for combi-CLEAs preparation

In order to optimize the conditions for combi-CLEAs preparation, an experimental design was performed, with two variables: glutaraldehyde concentration (mM) and reaction time (h). As responses, the total pectinase activity and RA were analyzed. As can be seen in Table 1, the highest RA (14.56 %) was obtained for the treatment 7 (110 mM of glutaraldehyde and 2 h of reaction time). The relationship between variables and response can be better understood by examining the contour plot depicted in Fig. 3. It can be seen that the RA of the combi-CLEAs is strongly affected by the two variables, showing an inverse

behavior of these variables for a good response. The best conditions were found when both variables were at opposite levels, i.e., at high concentrations of glutaraldehyde and short times or low glutaraldehyde and long reaction times.

Figure 3. Contour plots for the recovered activity varying glutaraldehyde concentration (mM) and reaction time (h).



The low RA of the combi-CLEAs could be explained by the difficult access for the substrate to the active sites of the enzymes, since pectin is a macromolecule and the pores inside the CLEA particles are relatively small. It results in internal mass-transfer limitations causing accessibility problem, which lowers the catalytic efficiency of CLEAs.<sup>25,34</sup> Moreover, modification of the enzyme with glutaraldehyde will produce additional negative effects on enzyme activity. The influence of glutaraldehyde on soluble enzyme was tested mixing a solution of  $0.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  enzyme concentration and  $110 \text{ mM}$  of glutaraldehyde at room temperature for 2 h. After 1 h, total pectinase activity was measured, and residual activity was

35 %, which remained unaltered until 2 h. Thus, the low recovered activity was not only due to internal mass transfer limitations, but also for glutaraldehyde effect on the enzyme activity. The high reactivity and extremely small size of glutaraldehyde, allowed it to penetrate in the protein active site, reacting with essential amino groups that are crucial for catalytic activity of the enzyme.<sup>28</sup>

Table 1. Experimental design and results of optimization for combi-CLEAs preparation.

<b>Experiments</b>	<b>X<sub>1</sub></b> (Glutaraldehyde-mM)	<b>X<sub>2</sub></b> (Time-h)	<b>CLEAs activity</b> (U.mL <sup>-1</sup> )	<b>Activity recovered</b> (%)
1	-1 (46)	-1 (4)	7.08	8.95
2	-1 (46)	1 (14)	10.72	13.72
3	1 (174)	-1 (4)	8.31	10.64
4	1 (174)	1 (14)	6.12	7.83
5	-1.41 (20)	0 (9)	10.41	13.32
6	1.41 (200)	0 (9)	6.25	8.00
7	0 (110)	-1.41 (2)	11.37	14.56
8	0 (110)	1.41 (16)	5.99	7.67
9	0 (110)	0 (9)	7.74	9.91
10	0 (110)	0 (9)	7.87	10.07
11	0 (110)	0 (9)	7.78	9.96

#### 3.4. Effect of enzyme concentration in the recovered activity of combi-CLEAs

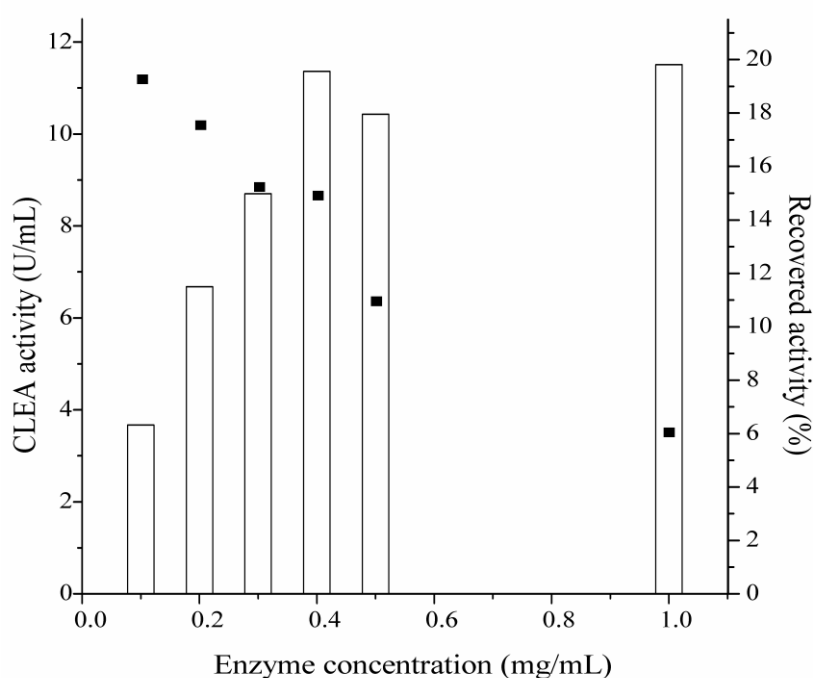
In order to improve the enzymatic activity of combi-CLEAs, experiments were performed varying the concentration of Rohapect® 10L extract (0.1 to 1.0 mg.mL<sup>-1</sup> of protein) for combi-CLEAs preparation. The optimized conditions of 110 mM of glutaraldehyde concentration and 2 h of reaction time were maintained.

As can be seen in Fig. 4, the enzymatic activity of combi-CLEAs increased with the amount of enzyme up to 0.4 mg.mL<sup>-1</sup>. Higher concentrations did not lead to an increase in expressed enzyme activity, the recovered activity decreased when larger amount of enzyme was used. Then, in order to obtain a CLEA with good enzymatic activity and high recovered activity, the enzyme concentration of 0.4 mg.mL<sup>-1</sup> was selected. The main cause for the



decrease in the RA at high protein concentrations could be the overload of enzymes in the particles. Higher protein concentrations lead to higher protein precipitation, and at same time there are many enzymes molecules inside the CLEAs particles, which leads to higher diffusion limitations.

Figure 4. Effect of the enzyme concentration in combi-CLEAs activity (bars) and recovered activity (points) under the conditions of 110 mM of glutaraldehyde and 2 h of reaction.



### 3.5. Effect of BSA in the combi-CLEAs preparation

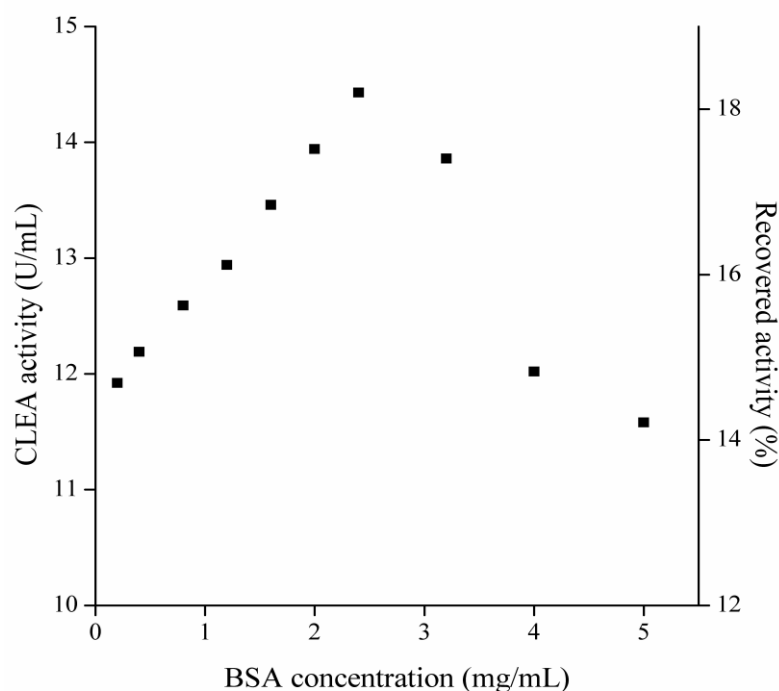
For improving the recovered activities of combi-CLEAs, different amounts of BSA (0.2 to 5.0 mg.mL<sup>-1</sup>) were added as proteic feeder to the enzymes during combi-CLEAs preparation. The addition of BSA is known to facilitate CLEAs preparation due the presence of a large amount of lysine residues in its surface, in which the cross-linker may bind.<sup>27</sup> Moreover, it dilutes the catalytic enzyme and may decrease diffusion limitations.

Analyzing the results of Fig. 5, it can be seen that BSA concentration had a positive effect up to 2.4 mg.mL<sup>-1</sup> on the expressed activity per mg of solid, even though the catalytic

enzymes were diluted. The increase of the combi-CLEAs-BSA activity compared to combi-CLEAs activity can be explained probably by a change in the morphology of the combi-CLEAs promoted by BSA. The BSA provides less compact aggregates with pores having larger diameters, facilitating the access of the substrate to active sites of enzymes, therefore the diffusion problems can be reduced.<sup>27</sup> Moreover, the addition of BSA increased the number of amino groups for cross-linking, since this protein has high Lys content (59 Lys residues),<sup>20</sup> allowing better enzyme retention after the immobilization.

On the other hand, BSA concentrations above 2.4 mg.mL<sup>-1</sup> provided a decrease in the recovered activity of the combi-CLEAs-BSA. The volumetric loading of the target enzyme is decreased by BSA, the inert protein (non-catalytic) will occupy a large portion of the volume.<sup>35</sup> Additionally, the higher BSA concentration favored a larger particle size increasing the diffusion problems.

Figure 5. Effect of the BSA concentration in combi-CLEAs activity and recovered activity under the conditions of 110 mM of glutaraldehyde, 2 h of reaction and 0.4 mg.mL<sup>-1</sup> of enzyme concentration.



### 3.6. Characterization of the soluble enzyme, combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA

After the preparation of combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA, they were characterized according to their residual activity of total pectinase (PE), polygalacturonase (PG), pectinlyase (PL), pectin methyl esterase (PME) and cellulase (CE), and compared to soluble enzyme activity (Table 3).

For all enzymatic activities analyzed, the combi-CLEAs-BSA presented higher values than combi-CLEAs by mass of CLEA. The CE activity can be highlighted, since its RA was 25 % for the combi-CLEAs-BSA, while for the combi-CLEAs, the recovered activity was only 7 %. These results show the advantages of using BSA during combi-CLEAs preparation, which could be possible due to the higher porosity of the particle provided by the BSA, facilitating the access of substrates and products inside the CLEA.<sup>27</sup>

Table 2. Enzymatic activities of the soluble enzyme, combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA

Treatments	Enzymatic activities (U.mL <sup>-1</sup> )				
	PE	PG	PL	PME	CE
Soluble enzyme	79.01	90.75	13.75	49.00	8.60
Combi-CLEA	11.72	5.49	0.96	2.13	0.58
Combi-CLEA-BSA	14.31	9.80	1.75	6.73	2.15

### 3.7. Thermal and pH stability

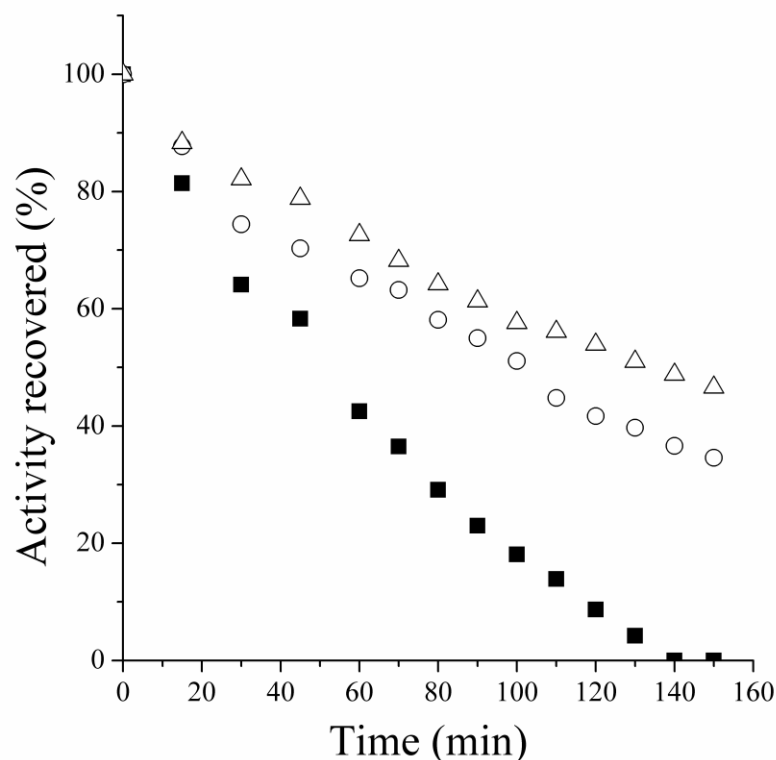
As can be seen in the Figure 6, thermal inactivation kinetics of soluble enzyme, combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA at 50 °C indicated a decreased enzyme activity along the time due to thermal inactivation. The thermal constant inactivation rate ( $k$ ) of the soluble enzyme was 0.0158 min<sup>-1</sup> and  $t_{1/2}$  was 43.87 min. For the combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA, a significant improvement in the thermal stability was observed, since  $k$  decreased (0.0068 and 0.0050 min, respectively) and  $t_{1/2}$  increased (103.45 and 133.30 min,

respectively), when compared to soluble enzyme, providing stabilization factors of 2.36 and 3.04, respectively for the combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA. These results are in agreement with several studies,<sup>20,36-41</sup> showing that enzymes in CLEAs are more stable than its soluble counterpart. After 150 min at 50 °C, while the soluble enzyme was completely inactivated, the combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA still presented 30.6 % and 43.3 % of activity, respectively.

These results confirm the advantages of using BSA for improving the thermal stability of the immobilized enzymes using the CLEAs technique. Similar results were found by Shah *et al.*,<sup>27</sup> and Cabana *et al.*,<sup>29</sup> which reported that the binding and protection of the enzymes in the aggregate containing BSA provided some protection of the enzyme structure at high temperatures, resulting in greater stability of the enzyme in the form of BSA-CLEAs. This high stability was also observed in many types of immobilized enzymes using organic or inorganic nanomaterials.<sup>42-48</sup> It can be due to the multipoint linkages of the enzyme with the polymer network and the intensified intramolecular H-bond.<sup>42,43</sup> In the combi-CLEAs, the multipoint interactions between glutaraldehyde and proteins (enzymes and BSA) provided a confinement effect for protein configuration, which increase the enzyme stability.

The stability of the enzymes was also evaluated in the pH of the grape juice (around 3.5). The soluble enzyme, combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA were incubated in sodium citrate buffer (50 mM, pH 3.5, 4 °C), and total pectinase activity was periodically measured. The enzymes were analyzed during 15 days of incubation and the enzyme activity remained constant along all time of incubation.

Figure 6. Thermal inactivation kinetics of soluble enzyme (■), combi-CLEAs (○) and combi-CLEAs-BSA (△) at 50 °C.



### 3.8. Optimal pH and temperature for the soluble enzyme, combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA

Three experimental designs were conducted to find the optimal temperature and pH for soluble enzyme, combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA. In the CCD, temperature (30 °C to 70 °C) and pH (3.0 to 6.0) were evaluated, and as response, the total pectinase activity was analyzed. The results for the experiments are presented in the Table 2. For the soluble enzyme as for the combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA, the optimal pH and temperature were similar, as can be seen in the contour plots (Figure 7). Among all treatments, the highest enzymatic activities were obtained for the treatment 3 (64 °C and pH 3.4), 135 U.mL<sup>-1</sup>, 21 U.mL<sup>-1</sup> and 28 U.mL<sup>-1</sup>, respectively for the soluble enzyme, combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA.

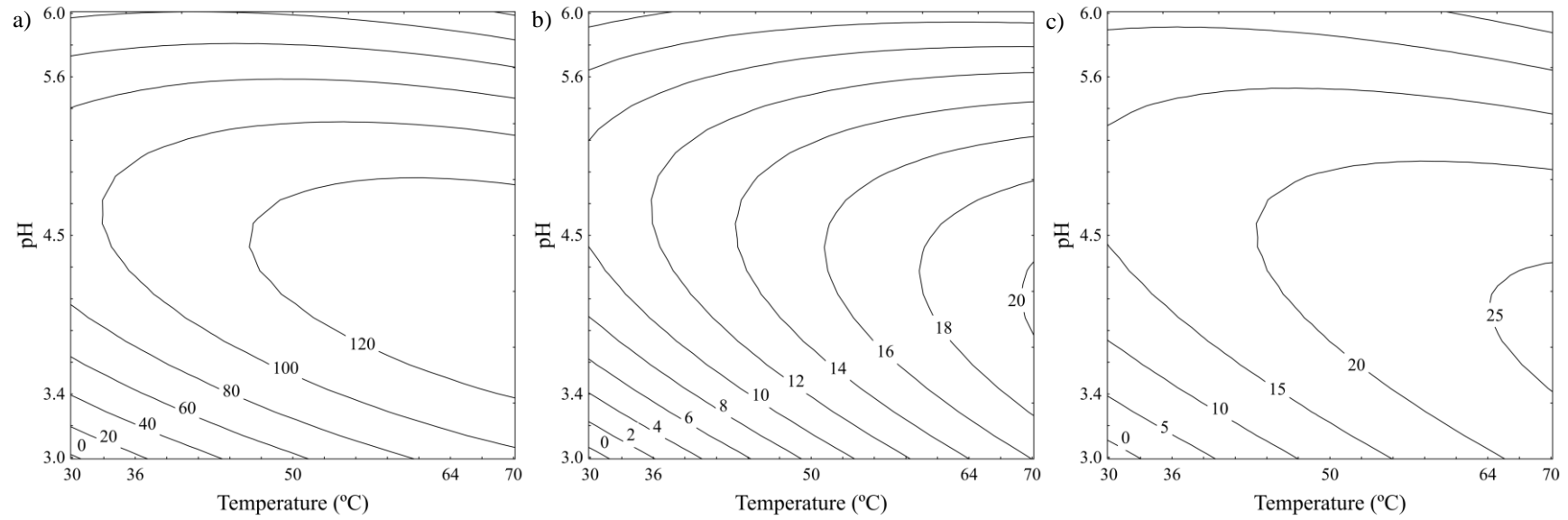
Table 3. Experimental design and results of optimal pH and temperature for soluble enzyme, combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA

Experiments	X <sub>1</sub> (Temperature)	X <sub>2</sub> (pH)	Enzymatic activities (U.mL <sup>-1</sup> )		
			Soluble enzyme	Combi-CLEAs	combi-CLEAs-BSA
1	-1 (36)	-1 (3.4)	76.70	7.89	11.66
2	-1 (36)	1 (5.6)	63.79	7.38	11.39
3	1 (64)	-1 (3.4)	135.15	20.50	28.04
4	1 (64)	1 (5.6)	63.24	12.35	12.24
5	-1.41 (30)	0 (4.5)	89.83	10.85	15.66
6	1.41 (70)	0 (4.5)	127.27	17.31	21.00
7	0 (50)	-1.41 (3.0)	31.17	5.23	7.02
8	0 (50)	1.41 (6.0)	53.72	8.41	9.48
9	0 (50)	0 (4.5)	125.73	15.68	21.70
10	0 (50)	0 (4.5)	122.89	15.30	21.43
11	0 (50)	0 (4.5)	124.42	16.12	22.00

These results agrees with Dalal *et al.*,<sup>34</sup> who did not find any changes in optimal conditions of pH and temperature for CLEA and soluble enzyme. However, Sangeetha and Abraham,<sup>40</sup> observed a broader optimum pH and temperature range for CLEA compared to soluble enzyme.

However, the optimal temperature, 64 °C, is close to the enzyme denaturation temperature. Despite the greatest enzymatic activity was found at high temperatures, this condition is not applied, since the enzyme inactivation is very quick under these conditions. Nevertheless, at lower temperatures, around 50 °C, the immobilized preparations presented good activity about 70 % of the maximum activity.

Figure 7. Contour plots of recovered activity for optimal pH and temperature for: a) soluble enzyme; b) combi-CLEAs; and c) combi-CLEAs-BSA.

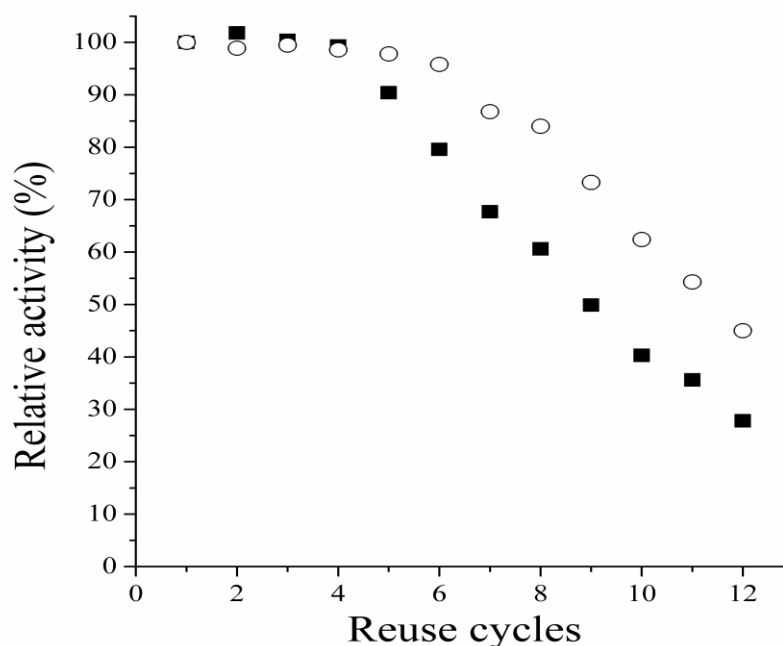


### 3.9. Operational stability

Operational stability is another important parameter to identify a suitable immobilized enzyme, because enzyme reuse is one of the main reasons of enzyme immobilization. To measure the operational stability of combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA, pectin was used as substrate and at the end of each cycle the concentration of reducing sugars released was measured.

The results presented in Figure 8 showed that the biocatalysts prepared could be reused during several cycles. In total, 12 cycles of hydrolysis were conducted, and until the fourth cycle, the combi-CLEAs presented 100 % of the initial activity. The combi-CLEAs-BSA could be reused during 6 cycles with 100 % of the initial activity. After these cycles, the combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA progressively decreased their enzymatic activities. At the end of the 12 cycles, combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA still presented 30 % and 46 % of initial activity, respectively.

Figure 8. Reusability of combi-CLEAs (■) and combi-CLEAs-BSA (○) for pectin hydrolysis.

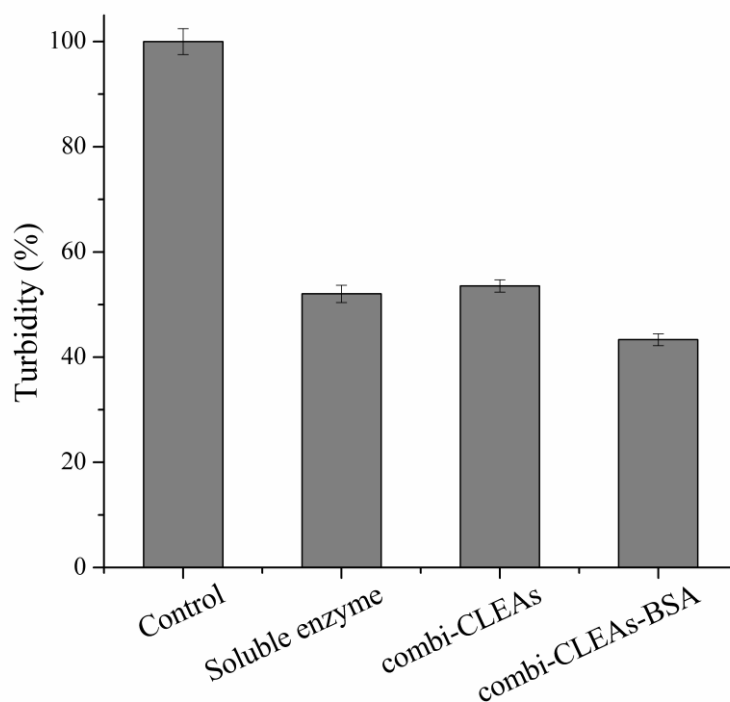




### 3.10. Grape juice clarification

Finally, the soluble enzyme, combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA were applied to grape juice clarification and the turbidity reduction was measured. As can be seen in Figure 9, the combi-CLEAs produced a turbidity reduction of 46.4 % near of the clarification values found for the soluble enzyme (47.9 %), while the combi-CLEAs-BSA obtained a turbidity reduction of 56.7 %, improving the clarification of grape juices obtained using the free enzymes. The high stability of the combi-CLEAs-BSA, as well as the larger porosity of the aggregates, may be responsible for the improvement in the clarification of the juice when compared to soluble enzyme and the combi-CLEAs. Moreover, if some reactions are in cascade, the product of the first enzyme will be at high concentrations and in the proximity of the other enzymes facilitating its catalytic transformation.

Figure 9. Grape juice clarification with soluble enzyme, combi-CLEAs and combi-CLEAs-BSA.



#### 4. Conclusions

In this paper, combi-CLEAs of pectinase and cellulase appear as a suitable strategy of immobilizing enzymes for application in the clarification of grape juice, presenting 2.36-times more thermal stability than the free enzyme, being reusable with total conversion of substrate to product for 4 cycles. The use of BSA as proteic feeder seems to be a good option to obtain an improved cross-linking. When combi-CLEAs were produced with BSA, higher enzymatic activities were achieved, and it provided 3.04-times more thermal stability than the soluble enzyme. Combi-CLEAs-BSA can be reused for 6 cycles with total conversion of substrate to product, and at the end of 12 cycles, the biocatalyst was still able to convert 46 % of substrate.

Despite the promising results of this study, these induce future researches to improve the results, e.g., testing other cross-linking agents to avoid glutaraldehyde effect in the enzyme activity, as well as, other rich sources of amino groups, or also the amination these enzymes, aiming to prepare a biocatalyst with high activity and stability.

#### Acknowledgments

This work was supported by grants and scholarships (L Dal Magro) from FAPERGS, CNPq (process 403505/2013-5), CAPES from Brazil, and MINECO from Spanish Government (project number CTQ2013-41507-R). The authors wish to thank Mr. Ramiro Martínez (Novozymes, Spain) and LNF Latinoamericana for kindly supplying the enzymes used in this research, as well as Vitivinicola Jolimont (Canela, Brazil) for providing the grape juice.

#### References

1. D. R. Kashyap, P. K. Vohra, S. Chopra and R. Tewari, *Bioresour. Technol.*, 2001, **77**, 215-227.

2. J. R. Whitaker, *Enzyme Microb. Technol.*, 1984, **6**, 341-349.
3. F. Vaillant, A. Millan, M. Dornier, M. Decloux and M. Reynes, *J. Food Eng.*, 2001, **48**, 83-90.
4. I. Romero-Cascales, J. M. Ros-García, J. M. López-Roca and E. Gómez-Plaza, *Food Chem.*, 2012, **130**, 626-631.
5. I. G. Sandri, R. C. Fontana, D. M. Barfknecht and M. M. da Silveira, *LWT - Food Sci. Technol.*, 2011, **44**, 2217-2222.
6. V. Khandare, S. Walia, M. Singh and C. Kaur, *Food and Bioproducts Processing*, 2011, **89**, 482-486.
7. M. Pinelo, B. Zeuner and A. S. Meyer, *Food and Bioproducts Processing*, 2010, **88**, 259-265.
8. M. A. Esawy, A. A. Gamal, Z. Kamel, A.-M. S. Ismail and A. F. Abdel-Fattah, *Carbohydr. Polym.*, 2013, **92**, 1463-1469.
9. N. Diano, T. Grimaldi, M. Bianco, S. Rossi, K. Gabrovska, G. Yordanova, T. Godjevargova, V. Grano, C. Nicolucci, L. Mita, U. Bencivenga, P. Canciglia and D. G. Mita, *J. Agric. Food. Chem.*, 2008, **56**, 11471-11477.
10. N. Demir, J. Acar, K. Sarioğlu and M. Mutlu, *J. Food Eng.*, 2001, **47**, 275-280.
11. C. Garcia-Galan, Á. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente and R. C. Rodrigues, *Adv. Synth. Catal.*, 2011, **353**, 2885-2904.
12. R. A. Sheldon and S. van Pelt, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 6223-6235.
13. R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.*, 2009, **45**, 405-418.
14. M. Asgher, M. Shahid, S. Kamal and H. M. N. Iqbal, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2014, **101**, 56-66.
15. A. Liese and L. Hilterhaus, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 6236-6249.
16. M. P. Klein, L. P. Fallavena, J. d. N. Schöffner, M. A. Z. Ayub, R. C. Rodrigues, J. L. Ninow and P. F. Hertz, *Carbohydr. Polym.*, 2013, **95**, 465-470.
17. R. A. Sheldon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, **92**, 467-477.
18. L. Cao, L. v. Langen and R. A. Sheldon, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2003, **14**, 387-394.
19. R. C. Rodrigues, Á. Berenguer-Murcia and R. Fernandez-Lafuente, *Adv. Synth. Catal.*, 2011, **353**, 2216-2238.

20. J. Cruz, O. Barbosa, R. C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, R. Torres and C. Ortiz, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2012, **80**, 7-14.
21. F. Kartal, M. H. A. Janssen, F. Hollmann, R. A. Sheldon and A. Kılinc, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2011, **71**, 85-89.
22. R. A. Sheldon, *Biochem. Soc. Trans.*, 2007, **35**, 1583-1587.
23. S. Talekar, A. Joshi, G. Joshi, P. Kamat, R. Haripurkar and S. Kambale, *RSC Advances*, 2013, **3**, 12485-12511.
24. J. C. S. D. Santos, O. Barbosa, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. C. Rodrigues and R. Fernandez-Lafuente, *ChemCatChem*, 2015, **7**, 2413-2432.
25. O. Barbosa, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. C. Rodrigues and R. Fernandez-Lafuente, *RSC Advances*, 2014, **4**, 1583-1600.
26. M. Galvis, O. Barbosa, M. Ruiz, J. Cruz, C. Ortiz, R. Torres and R. Fernandez-Lafuente, *Process Biochem.*, 2012, **47**, 2373-2378.
27. S. Shah, A. Sharma and M. N. Gupta, *Anal. Biochem.*, 2006, **351**, 207-213.
28. C. Mateo, J. M. Palomo, L. M. van Langen, F. van Rantwijk and R. A. Sheldon, *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, **86**, 273-276.
29. H. Cabana, J. P. Jones and S. N. Agathos, *J. Biotechnol.*, 2007, **132**, 23-31.
30. H. W. Yu, H. Chen, X. Wang, Y. Y. Yang and C. B. Ching, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2006, **43**, 124-127.
31. L. Dal Magro, D. Goetze, C. T. Ribeiro, N. Paludo, E. Rodrigues, P. F. Hertz, M. P. Klein and R. C. Rodrigues, *Food Bioprocess Technol*, 2016, **9**, 365-377.
32. C. W. Anderson, in *Techniques of Water-Resources Investigations*, Geological Survey (U.S.), Version 2.1 edn., 2005, vol. 2.1, ch. A6, p. 55.
33. G. L. Miller, *Anal. Chem.*, 1959, **31**, 426-428.
34. S. Dalal, M. Kapoor and M. N. Gupta, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2007, **44**, 128-132.
35. R. C. Rodrigues, O. Barbosa, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. Torres and R. Fernandez-Lafuente, *RSC Advances*, 2014, **4**, 38350-38374.
36. S. S. Nadar, A. B. Muley, M. R. Ladole and P. U. Joshi, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2016, **84**, 69-78.
37. S. S. Nadar and V. K. Rathod, *Enzyme Microb. Technol.*, 2016, **83**, 78-87.
38. B. S. Aytar and U. Bakir, *Process Biochem.*, 2008, **43**, 125-131.

39. A. Bhattacharya and B. I. Pletschke, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2015, **115**, 140-150.
40. K. Sangeetha and T. E. Abraham, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2008, **43**, 314-319.
41. S. Talekar, A. Pandharbale, M. Ladole, S. Nadar, M. Mulla, K. Japhalekar, K.
42. J. Ge, D. Lu, J. Wang, M. Yan, Y. Lu and Z. Liu, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 14319-14324.
43. J. Ge, D. Lu, J. Wang and Z. Liu, *Biomacromolecules*, 2009, **10**, 1612-1618.
44. J. Ge, J. Lei and R. N. Zare, *Nat. Nanotechnol.*, 2012, **7**, 428-432.
45. Z. Li, Y. Zhang, Y. Su, P. Ouyang, J. Ge and Z. Liu, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 12465-12468.
46. F. Lyu, Y. Zhang, R. N. Zare, J. Ge and Z. Liu, *Nano Lett.*, 2014, **14**, 5761-5765.
47. X. Wu, J. Ge, C. Yang, M. Hou and Z. Liu, *Chem. Commun.*, 2015a, **51**, 13408-13411.
48. X. Wu, C. Yang, J. Ge and Z. Liu, *Nanoscale*, 2015b, **7**, 18883-18886.

## CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO GERAL

A presente dissertação de Mestrado teve como objetivo estudar a influência da composição dos diferentes preparados enzimáticos na extração, qualidade e compostos bioativos do suco de uva elaborado com a variedade Concord. Dentro do tema proposto, investigou-se os efeitos de oito diferentes preparados enzimáticos no rendimento e na qualidade do suco de uva, observando a influência no perfil de compostos bioativos. Subsequentemente, definiu-se um planejamento experimental, a fim de determinar as melhores condições de tempo, temperatura, concentração de enzima e proporção de Pectinex® Ultra Clear/Lallzyme® Beta para a otimização da extração do suco de uva. Na parte final, estudaram-se estratégias para a preparação de combi-CLEAs ativos e estáveis para a clarificação do suco de uva.

Inicialmente, os oito preparados enzimáticos utilizados foram caracterizados, segundo suas atividades enzimáticas de pectinase total, poligalacturonase, pectina liase, pectina metil esterase e celulase. A partir dessa caracterização, os preparados foram padronizados por U de pectinase total e aplicados no suco para obter uma melhor comparação entre eles. Parâmetros de qualidade como cor, sólidos solúveis totais (°Brix), açúcares redutores, acidez total, pH e capacidade antioxidante foram determinados para todas as amostras. Os compostos fenólicos e antocianinas foram identificados e quantificados por HPLC-DAD-MS. A Pectinex® Ultra Clear apresentou elevadas concentrações de poligalacturonase e pectina metil esterase, resultando em um aumento de 9 % no rendimento do suco. Além disso, as preparações enzimáticas com alto teor de pectina liase, como Pectinex® BE XXL, também alcançaram bons rendimentos de suco. Estes resultados estão diretamente ligados com a eficiente hidrólise da pectina, visto que a PG e PME atuam em conjunto na degradação da pectina, enquanto que a PL hidrolisa pectina, sem a necessidade da ação prévia de enzimas desesterificantes.

Por outro lado, preparações enzimáticas com alta concentração de celulasas, como Lallzyme® Beta, proporcionaram sucos com maior teor de açúcares, através da maior hidrólise da celulose. Além disso, os preparados com maior atividade de CE, também contribuíram para a melhor extração de compostos bioativos. Dentre estes, o preparado Lallzyme® Beta proporcionou um aumento de 60 % na quantidade total de antocianinas, contribuindo para melhorar a coloração e o potencial antioxidante do suco. Estes resultados podem ser explicados pela eficiente hidrólise da parede celular, que possui elevado teor de celulose. Assim, preparações enzimáticas com altas concentrações de enzimas celulolíticas podem proporcionar maior liberação de componentes intracelulares.

No seguinte passo, visto que a Pectinex® Ultra Clear (PUC) obteve bons resultados para o rendimento, enquanto a Lallzyme® Beta (LB) apresentou bons resultados para a extração de compostos bioativos, o efeito sinérgico desses dois preparados na produção do suco foi avaliado. Um delineamento de composto central (DCC) e a metodologia de superfície de resposta (RSM) foram usados para avaliar as variáveis de temperatura, tempo, concentração de enzima e razão de PUC/LB, tendo como variáveis de resposta o rendimento e a capacidade redutora dos sucos. Temperaturas elevadas proporcionaram maior extração de compostos fenólicos, mas, por outro lado, temperaturas acima de 60 °C provocaram a desnaturação das enzimas, proporcionando baixos rendimentos de suco. Em geral, o tempo necessário para obter uma boa extração do suco é inversamente proporcional à concentração de enzima em temperatura ótima, ou seja, resultados satisfatórios podem ser alcançados utilizando curtos tempos e maiores concentrações de enzimas, ou longos tempos e menores concentrações de enzimas. Em relação a razão PUC/LB foi observado um aumento do rendimento de suco com maior concentração de PUC em relação a LB, por outro lado, nesta condição, um comportamento negativo foi verificado para capacidade redutora dos sucos, confirmando os resultados obtidos no primeiro trabalho.

Assim, as condições ótimas para a extração do suco, possibilitando um aumento tanto do rendimento, como da capacidade reductora, foram: temperatura de 51 °C, tempo de reação de 52 min, concentração de enzima de 0,75 U.g<sup>-1</sup> e razão PUC/LB de 0,52. Nestas condições, a mistura dos dois preparados enzimáticos na razão de 0,52 (PUC/LB) e os preparados em separado foram utilizados para a produção do suco de uva. Parâmetros de qualidade como cor, sólidos solúveis totais (°Brix), açúcares redutores, acidez total, pH e capacidade antioxidante foram determinados para essas amostras. Os compostos fenólicos e antocianinas foram identificados e quantificados por HPLC-DAD-MS. A mistura dos dois preparados enzimáticos proporcionou os melhores rendimentos, bem como altas taxas de extração de compostos bioativos, verificando a importância do efeito sinérgico das pectinases e celulases na hidrólise dos polissacarídeos das paredes celulares para a liberação do suco e dos compostos intracelulares.

A última etapa do trabalho foi a produção, caracterização e aplicação dos combi-CLEAs de pectinases e celulases para clarificação do suco de uva. Agregados enzimáticos entrecruzados foram escolhidos como método de imobilização das enzimas, pois os preparados enzimáticos utilizados na elaboração do suco de uva possuem um grande número de enzimas em sua composição, onde as enzimas atuam de forma sinérgica na degradação dos componentes das uvas. Assim, com a produção dos combi-CLEAs, é possível obter uma massa insolúvel composta por várias enzimas. Os primeiros testes realizados definiram a escolha do preparado enzimático com maior potencial de clarificação, sendo escolhido o preparado comercial Rohapect® 10L. Em seguida, experimentos avaliando a influência de agentes precipitantes (acetona, etanol, álcool iso-propílico, terc-butanol e sulfato de amônio saturado) foram realizados. O álcool iso-propílico foi escolhido como agente precipitante por ter sido possível recuperar as maiores atividades enzimáticas.



A produção dos combi-CLEAs foi estudada em um DCC e MSR, onde foram avaliadas as variáveis: concentração de glutaraldeído e tempo de reação. Como resposta, a atividade de pectinase total foi medida. Estas duas variáveis mostraram um efeito de interação, onde as melhores atividades recuperadas foram alcançadas com curtos tempos de reação e maiores concentração de glutaraldeído, entretanto, com tempos longos de reação e menores concentrações de glutaraldeído, resultados similares foram encontrados. Além disso, testes variando a concentração de enzima e de albumina do soro bovino (BSA) foram realizados. Em relação a concentração de enzimas, verificou-se um aumento na atividade enzimática dos combi-CLEAs utilizando até  $0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$  de enzima. Já para atividade recuperada, um comportamento negativo foi observado com o aumento da concentração de enzima. Em relação à concentração de BSA, observou-se um aumento na atividade recuperada dos combi-CLEAs-BSA até  $2,4 \text{ mg.mL}^{-1}$ , o que contribuiu para aumentar a porosidade do combi-CLEAs-BSA, facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo das enzimas. A partir dessa concentração de BSA foi observado uma diminuição da atividade dos combi-CLEAs-BSA, provavelmente devido ao aumento da massa inerte no combi-CLEA pela grande quantidade dessa proteína sem atividade catalítica.

A enzima solúvel, os combi-CLEAs e os combi-CLEAs-BSA foram caracterizados em relação as suas atividades enzimáticas, pHs e temperaturas ótimas, estabilidade térmica e ao pH e estabilidade operacional durante a hidrólise da pectina. Em relação as atividades enzimáticas analisadas, pode-se destacar o efeito do BSA, contribuindo para a maior recuperação das atividades dos combi-CLEAs-BSA, para todas as enzimas. O BSA também contribuiu para aumentar a estabilidade térmica dos combi-CLEAs-BSA, apresentando um fator de estabilização de 3,04 em comparação com a enzima solúvel. Os combi-CLEAs-BSA também se mostraram mais estáveis operacionalmente, podendo ser reutilizados por 6 ciclos

mantendo próximo de 100 % da sua atividade inicial, enquanto que os combi-CLEAs puderam ser reutilizados por 4 ciclos.

Por fim, os mesmos foram aplicados no suco e a redução da turbidez foi avaliada. Os combi-CLEAs apresentaram uma redução na turbidez de 46,4%, próximo dos resultados obtidos pela enzima solúvel (47,9 %), enquanto que os combi-CLEAs-BSA apresentaram 56,7 % de redução na turbidez, melhorando a clarificação do suco de uva. Os combi-CLEAs se mostraram como ótima opção de enzimas imobilizadas para a clarificação do suco de uva, destacando o uso de BSA como uma fonte de proteína rica em grupamentos amino, a qual conferiu os melhores resultados de recuperação de atividade, estabilidade térmica, reusos e clarificação do suco para o combi-CLEA-BSA. Estes resultados estão ligados com uma mudança na morfologia dos combi-CLEAs proporcionado pela adição de BSA, melhorando as ligações multipontuais das enzimas com o BSA, além de contribuir para o aumento da porosidade dos combi-CLEAs-BSA, o que minimiza os problemas de difusão de massa.

## CONCLUSÃO

Como conclusão geral, pode-se afirmar que o trabalho atingiu os objetivos propostos, proporcionando melhorias produtivas e qualitativas ao suco de uva através da tecnologia enzimática, sendo que as principais conclusões obtidas foram:

- Preparações enzimáticas com altas atividades de poligalacturonase e pectina metil esterase ou pectina liase proporcionam elevados rendimentos de suco de uva;
- Preparações enzimáticas com altas atividades de celulasas proporcionam maiores extrações de compostos bioativos e açúcares;
- O efeito sinérgico das pectinases e celulasas, juntamente com as condições ótimas de extração otimizam a liberação do suco e dos compostos intracelulares;
- Combi-CLEAs é uma metodologia muito promissora para a clarificação do suco de uva, através da imobilização de várias enzimas no mesmo agregado insolúvel, que atuam sinergicamente na hidrólise dos polissacarídeos responsáveis pela turbidez;
- Combi-CLEAs com elevada atividade catalítica, estável, reutilizável e com bons resultados na clarificação do suco podem ser obtidos com a utilização de uma fonte de proteína rica em grupamentos amino, como a albumina do soro bovino.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Por fim, os resultados obtidos nessa Dissertação de Mestrado representam contribuições relevantes no campo da tecnologia enzimática para a produção de sucos de uva. Contudo, abrem-se perspectivas para trabalhos futuros, buscando a inovação e as melhorias tecnológicas.

Assim, uma das ideias sugeridas é a purificação desses preparados enzimáticos, possibilitando uma análise da cinética enzimática e estabilidade operacional de cada enzima, proporcionando um melhor entendimento do seu funcionamento na extração do suco, podendo, assim, a dosagem de cada enzima ser ajustada separadamente, buscando um maior desempenho na extração dos sucos.

Em relação à produção dos combi-CLEAs, sugere-se um estudo da superfície das pectinases e celulasas, a fim de qualificar o número e a posição dos grupamentos amino reativos, possibilitando assim uma melhor escolha do agente entrecruzante. Além disso, pode-se utilizar outra fonte rica em grupamentos amino, ou buscar uma metodologia para aaminação química destas enzimas, permitindo a produção de um biocatalisador altamente catalítico e estável.

Como perspectiva futura na obtenção dos CLEAs, tem-se os combi-CLEAs magnéticos que poderão ser utilizados para facilitar a separação do suco pela simples aplicação de um campo magnético, já que a matriz do suco é rica em compostos fenólicos e polissacarídeos.

Além disso, a construção de um reator com combi-CLEAs seria de grande relevância para a clarificação dos sucos, possibilitando um melhor controle do processo e operação contínua, sendo uma tecnologia promissora para aplicação na indústria.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, L. T., R. V. d. Mota, et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 27, p. 394-400, 2007.
- Albersheim, P.; Killias, U. Studies relating to the purification and properties of pectin transesterase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 97, p. 107-115, 1962.
- Alkorta, I.; Garbisu, C.; Llama, M. J.; Serra, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 21-28, 1998.
- Anderson, C. W. Turbidity. In **Techniques of Water-Resources Investigations**, Geological Survey (U.S.), v. 2.1, ch. A6, p. 55, 2005.
- Arantes, V.; Saddler, J. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 1-11, 2010.
- Asgher, M.; Shahid, M.; Kamal, S.; Iqbal, H. M. N. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 56-66, 2014.
- Aviram, M.; Fuhrman, B. Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. **Alcohol and Wine in Health and Disease**. New York Acad Sciences, New York, v. 957, p. 146-161, 2002.
- Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.
- Barbosa, O.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, A.; Torres, R.; Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advances**, v. 4, p. 1583-1600, 2014.
- Barnabé, D.; Venturini Filho, W. G.; Bolini, H. M. A. Análise descritiva quantitativa de vinhos produzidos com uvas Niágara Rosada e Bordô. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 10, p. 122-129, 2007.
- Bautista-Ortín, A. B.; Martínez-Cutillas, A.; Ros-García, J. M.; López-Roca, J. M.; Gómez-Plaza, E. Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 40, p. 867-878, 2005.
- Bhat, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355-383, 2000.

Bhat, M. K.; Bhat, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 583-620, 1997.

Bhattacharya, A.; Pletschke, B. I. Magnetic cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel concept towards carrier free immobilization of lignocellulolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 61–62, p. 17-27, 2014.

Bhattacharya, A.; Pletschke, B. I. Strategic optimization of xylanase–mannanase combi-CLEAs for synergistic and efficient hydrolysis of complex lignocellulosic substrates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 140-150, 2015.

BRASIL. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamento da Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de bebidas. **Lex: coletânea de legislação: edição federal**, Brasília, 2009.

Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317-333, 1998.

Brownleader, M. D.; Jackson, P.; Mobasher, A.; Pantelides, A. T.; Sumar, S.; Trevan, M.; Dey, P. M. Molecular aspects of cell wall modifications during fruit ripening. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 39, p. 149-164, 1999.

Cabrita, M. J.; Silva, J. R. da; Laureano, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. **Revista árvore**, v. 26, p. 485-492, 2002.

Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: Structure activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, p. 749-760, 1997.

Cao, L.; Langen, L. v.; Sheldon, R. A. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 387-394, 2003.

Capanoglu, E.; Vos, R. C. H. d.; Hall, R. D.; Boyacioglu, D.; Beekwilder, J. Changes in polyphenol content during production of grape juice concentrate. **Food Chemistry**, 139, 521-526, 2013.

Castilla, P.; Echarri, R.; Dávalos, A.; Cerrato, F.; Ortega, H.; Teruel, J. L.; Lucas, M. F.; Gómez-Coronado, D.; Ortuño, J.; Lasunción, M. A. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, p. 252-262, 2006.

Castro, A. M. d.; Pereira Jr, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

Coimbra, S. R.; Lage, S. H.; Brandizzi, L.; Yoshida, V.; da Luz, P. L. The action of red wine and purple grape juice on vascular reactivity is independent of plasma lipids in hypercholesterolemic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1339-1347, 2005.

Cruz, J.; Barbosa, O.; Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R.; Torres, R.; Ortiz, C. Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 80, p. 7-14, 2012.

Cuvelier, M. E.; Richard, H.; Berset, C. Comparison of the antioxidant activity of some acid phenols: structure-activity relationship. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.59, p.324-325,1992.

Dalla-Vecchia, R.; Nascimento, M. d. G.; Soldi, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quimica Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

Dani, C.; Oliboni, L. F.; Pasquali, M. A. B.; Oliveira, M. R.; Umezu, F. M.; Salvador, M.; Moreira, J. C. F.; Henriques, J. A. Intake of purple grape juice as a hepatoprotective agent in Wistar rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 127-132, 2008.

Dani, C.; Oliboni, L. S.; Umezu, F. M.; Pasquali, M. A.; Salvador, M.; Moreira, J. C.; Henriques, J. A. Antioxidant and antigenotoxic activities of purple grape juice--organic and conventional--in adult rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, p. 1111-1118, 2009.

Daroit, D. J.; Silveira, S. T.; Hertz, P. F.; Brandelli, A. Production of extracellular  $\beta$ -glucosidase by *Monascus purpureus* on different growth substrates. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 904-908, 2007.

Dávalos, A.; Fernández-Hernando, C.; Cerrato, F.; Martínez-Botas, J.; Gómez-Coronado, D.; Gómez-Cordovés, C.; Lasunción, M. A. Red Grape Juice Polyphenols Alter Cholesterol Homeostasis and Increase LDL-Receptor Activity in Human Cells In Vitro. **The Journal of Nutrition**, v. 136, p. 1766-1773, 2006.

Dohadwala, M. M.; Vita, J. A. Grapes and Cardiovascular Disease. **The Journal of Nutrition**, v. 139, p. 1788-1793, 2009.

Facco, E. M. P. Compostos funcionais no processamento de vinhos. **Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, p. 145, 2006.

Flanzy, C. **Enología: Fundamentos Científicos Y Tecnológicos**. Madrid: Mundi Prensa, p. 786, 2000.

Franco, G. Tabela de composição química dos alimentos. 9.ed. São Paulo: Atheneu, p. 307, 1999.

Garcia-Galan, C.; Berenguer-Murcia, Á.; Fernandez-Lafuente, R.; Rodrigues, R. C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, p. 2885-2904, 2011.

Ghose, T. K. Measurement of Cellulase Activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

Giovannini, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. Renascença, ed. 3<sup>a</sup>, Porto Alegre, p. 362, 2008.

Guerra, C. C. Compostos fenólicos do vinho. In: Souza Filho, J. M. de; Manfroi, V. **Vinho e saúde: vinho como alimento natural**. Bento Gonçalves: Ibravin, p. 39, 2005.

Guisán, J. M. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Humana Press, ed. 2<sup>a</sup>, Totowa, p. 449, 2006.

Han, S. O.; Cho, H. Y.; Yukawa, H.; Inui, M.; Doi, R. H. Regulation of expression of cellulosomes and noncellulosomal (hemi)cellulolytic enzymes in *Clostridium cellulovorans* during growth on different carbon sources. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 4218-4227, 2004.

Hanefeld, U.; Gardossi, L.; Magner, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 453-468, 2009.

James, N. B. An Introduction to Pectins: Structure and Properties. **Chemistry and Function of Pectins**. American Chemical Society, v. 310, p. 2-12, 1986.

Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G. O.; Slowing, K. V.; Thomas, C. F.; Beecher, C. W. W.; Fong, H. H. S.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D.; Mehta, R. G.; Moon, R. C.; Pezzuto, J. M. Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. **Science**, v. 275, p. 218-220, 1997.

Jayani, R. S.; Saxena, S.; Gupta, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

Joseph, J. A.; Shukitt-Hale, B.; Willis, L. M. Grape Juice, Berries, and Walnuts Affect Brain Aging and Behavior. **The Journal of Nutrition**, v. 139, p. 1813-1817, 2009.

Jung, D.-H.; Jung, J.-H.; Seo, D.-H.; Ha, S.-J.; Kweon, D.-K.; Park, C.-S. One-pot bioconversion of sucrose to trehalose using enzymatic sequential reactions in combined cross-linked enzyme aggregates. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 801-804, 2013.

Kartal, F.; Janssen, M. H. A.; Hollmann, F.; Sheldon, R. A.; Kilinc, A. Improved esterification activity of *Candida rugosa* lipase in organic solvent by immobilization as Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, p. 85-89, 2011.

Kashyap, D. R.; Vohra, P. K.; Chopra, S.; Tewari, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

Khandare, V.; Walia, S.; Singh, M.; Kaur, C. Black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus*) juice: Processing effects on antioxidant composition and color. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 482-486, 2011.



Klein, M. P.; Fallavena, L. P.; Schöffner, J. d. N.; Ayub, M. A. Z.; Rodrigues, R. C.; Ninow, J. L.; Hertz, P. F. High stability of immobilized  $\beta$ -d-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 465-470, 2013.

Krikorian, R.; Boespflug, E. L.; Fleck, D. E.; Stein, A. L.; Wightman, J. D.; Shidler, M. D.; Sadat-Hossieny, S. Concord Grape Juice Supplementation and Neurocognitive Function in Human Aging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5736-5742, 2012.

Krikorian, R.; Nash, T. A.; Shidler, M. D.; Shukitt-Hale, B.; Joseph, J. A. Concord grape juice supplementation improves memory function in older adults with mild cognitive impairment. **British Journal of Nutrition**, v. 103, p. 730-734, 2010.

Lea, A. G. H. Enzymes in the production of beverages and fruit juices. **Enzymes in Food Processing**. Springer US, v. 1, p. 223-249, 1995.

Lei, Z.; Bi, S. The silica-coated chitosan particle from a layer-by-layer approach for pectinase immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1442-1447, 2007.

Liese, A.; Hilterhaus, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6236-6249, 2013.

López-Gallego, F.; Betancor, L.; Hidalgo, A.; Alonso, N.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. Co-aggregation of Enzymes and Polyethyleneimine: A Simple Method To Prepare Stable and Immobilized Derivatives of Glutaryl Acylase. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 1839-1842, 2005.

Lorenzoni, A. S. G.; Aydos, L. F.; Klein, M. P.; Rodrigues, R. C.; Hertz, P. F. Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 193-197, 2014.

Lynd, L. R.; Weimer, P. J.; Van Zyl, W. H.; Pretorius, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002.

Martins, E. Purificação e caracterização bioquímica de poligalacturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação submersa e fermentação em estado sólidos. **Tese de Doutorado em Ciências Biológicas**. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, p. 108, 2006.

Marinova, E. M.; Yanishlieva, N. V. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. **Food Chemistry**, v. 81, p.189-197, 2003.

Mello, L. M. R. de; Machado, C. A. E.; Silva, S. M. R. DA. **Dados cadastrais da viticultura do Rio Grande do Sul: 2008 a 2012**. Brasília, DF: Embrapa, p. 21, 2013.

Mieszczakowska-Fraç, M.; Markowski, J.; Zbrzeźniak, M.; Płocharski, W. Impact of enzyme on quality of blackcurrant and plum juices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, p. 251-256, 2012.

Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

Modun, D.; Music, I.; Vukovic, J.; Brizic, I.; Katalinic, V.; Obad, A.; Palada, I.; Dujic, Z.; Boban, M. The increase in human plasma antioxidant capacity after red wine consumption is due to both plasma urate and wine polyphenols. **Atherosclerosis**, v. 197, p. 250-256, 2008.

Morris, J. R.; Striegler, K. Grape juice: factors that influence quality, processing technology and economics. **Fruits: major processed products**. Technomic Publishing Company, Lancaster, PA., v. p. 328-348, 1996.

Mudnic, I.; Modun, D.; Rastija, V.; Vukovic, J.; Brizic, I.; Katalinic, V.; Kozina, B.; Medic-Saric, M.; Boban, M. Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1205-1210, 2010.

Nadar, S. S.; Muley, A. B.; Ladole, M. R.; Joshi, P. U. Macromolecular cross-linked enzyme aggregates (M-CLEAs) of  $\alpha$ -amylase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 84, p. 69-78, 2016.

Percival, S. S. Grape Consumption Supports Immunity in Animals and Humans. **The Journal of Nutrition**, v. 139, p. 1801-1805, 2009.

Percival Zhang, Y. H.; Himmel, M. E.; Mielenz, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.

Pilnik, W.; Voragen, A. G. J. CHAPTER 14 - Pectic Enzymes in Fruit and Vegetable Juice Manufacture. **Enzymes in Food Processing (Third Edition)**. Academic Press, London, v. p. 363-399, 1993.

Pinelo, M.; Zeuner, B.; Meyer, A. S. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, p. 259-265, 2010.

Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E. **Biologia vegetal**. Guanabara Koogan S.A., ed. 7<sup>a</sup>, Rio de Janeiro, p. 830, 2007.

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Bunourdieu, D. **Tratado de enología: química del vino, estabilización y tratamientos**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, p. 554, 2002.

Rizzon, L. A.; Link, M. Composição de sucos caseiro de diferentes cultivares. **Ciência Rural**, v.36, p. 689-692, 2006.

Rizzon, L. A.; Manfroi, V.; Meneguzzo, J. **Elaboração de suco de uva na propriedade vitícola**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p. 24, 1998.

Rizzon, L. A.; Miele, A. Características analíticas de sucos de uva elaborados no Rio Grande do Sul. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 129–123, 1995.

Rodrigues, E.; Mariutti, L. R. B.; Mercadante, A. Z. Carotenoids and Phenolic Compounds from *Solanum sessiliflorum*, an Unexploited Amazonian Fruit, and Their Scavenging Capacities against Reactive Oxygen and Nitrogen Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 3022-3029, 2013.

Romaškevič, T.; Budrienė, S.; Pielichowski, K.; Pielichowski, J. Application of polyurethane-based materials for immobilization of enzymes and cells: a review. **Chemija**, v. 17, p. 74-89, 2006.

Romero-Cascales, I.; Ros-García, J. M.; López-Roca, J. M.; Gómez-Plaza, E. The effect of a commercial pectolytic enzyme on grape skin cell wall degradation and colour evolution during the maceration process. **Food Chemistry**, v. 130, p. 626-631, 2012.

Rouse, A. H.; Atkins, C. D. Heat inactivation of pectinesterase in citrus juices. **Food Technology**, v. 6, p. 291-294, 1952.

Rowe, C. A.; Nantz, M. P.; Nieves, C.; West, R. L.; Percival, S. S. Regular Consumption of Concord Grape Juice Benefits Human Immunity. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 69-78, 2010.

Saha, B. C. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1871-1876, 2004.

Sandgren, M.; Ståhlberg, J.; Mitchinson, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 89, p. 246-291, 2005.

Sandri, I. G.; Fontana, R. C.; Barfknecht, D. M.; Silveira, M. M. Clarification of fruit juices by fungal pectinases. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 2217-2222, 2011.

Sankaran, A. K.; Nijse, J.; Bialek, L.; Bouwens, L.; Hendrickx, M. E.; van Loey, A. M. Effect of Enzyme Homogenization on the Physical Properties of Carrot Cell Wall Suspensions. **Food and Bioprocess Technology**, v. p., 2015.

Schoevaart, R.; Wolbers, M. W.; Golubovic, M.; Ottens, M.; Kieboom, A. P. G.; Van Rantwijk, F.; Van der Wielen, L. A. M.; Sheldon, R. A. Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 87, p. 754–762, 2004.

Shah, S.; Sharma, A.; Gupta, M. N. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. **Analytical Biochemistry**, v. 351, p. 207-213, 2006.

Sheldon, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, p. 1289-1307, 2007.

Sheldon, R. A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, p. 467-477, 2011.

Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

Sowbhagya, H. B.; Chitra, V. N. Enzyme-assisted extraction of flavorings and colorants from plant materials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, p. 146–161, 2010.

Stalmach, A.; Edwards, C. A.; Wightman, J. D.; Crozier, A. Identification of (Poly)phenolic Compounds in Concord Grape Juice and Their Metabolites in Human Plasma and Urine after Juice Consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 9512-9522, 2011.

Taboada-Puig, R.; Junghanns, C.; Demarche, P.; Moreira, M. T.; Feijoo, G.; Lema, J. M.; Agathos, S. N. Combined cross-linked enzyme aggregates from versatile peroxidase and glucose oxidase: Production, partial characterization and application for the elimination of endocrine disruptors. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6593-6599, 2011.

Talekar, S.; Joshi, A.; Joshi, G.; Kamat, P.; Haripurkar, R.; Kambale, S. Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). **RSC Advances**, v. 3, p. 12485-12511, 2013.

Tapre, A. R.; Jain, R. K. Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. **International Food Research Journal**, v. 21, p. 447-453, 2014.

Tiwari, B. K.; Patras, A.; Brunton, N.; Cullen, P. J.; O'Donnell, C. P. Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, p. 598-604, 2010.

Uenojo, M.; Pastore, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 388-394, 2007.

Ursini, F.; Sevanian, A. Wine polyphenols and optimal nutrition. **Alcohol and Wine in Health and Disease**. New York Acad Sciences, New York, v. 957, p. 200-209, 2002.

UVIBRA. União Brasileira de Vitivinicultura. **Comercialização de Vinhos e Derivados Elaborados de 2010 a 2015**. Disponível em [http://www.uvibra.com.br/pdf/comercializacao2010a2015\\_nov.pdf](http://www.uvibra.com.br/pdf/comercializacao2010a2015_nov.pdf). Acesso em 24/01/2016.

Vaillant, F.; Millan, A.; Dornier, M.; Decloux, M.; Reynes, M. Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 48, p. 83-90, 2001.

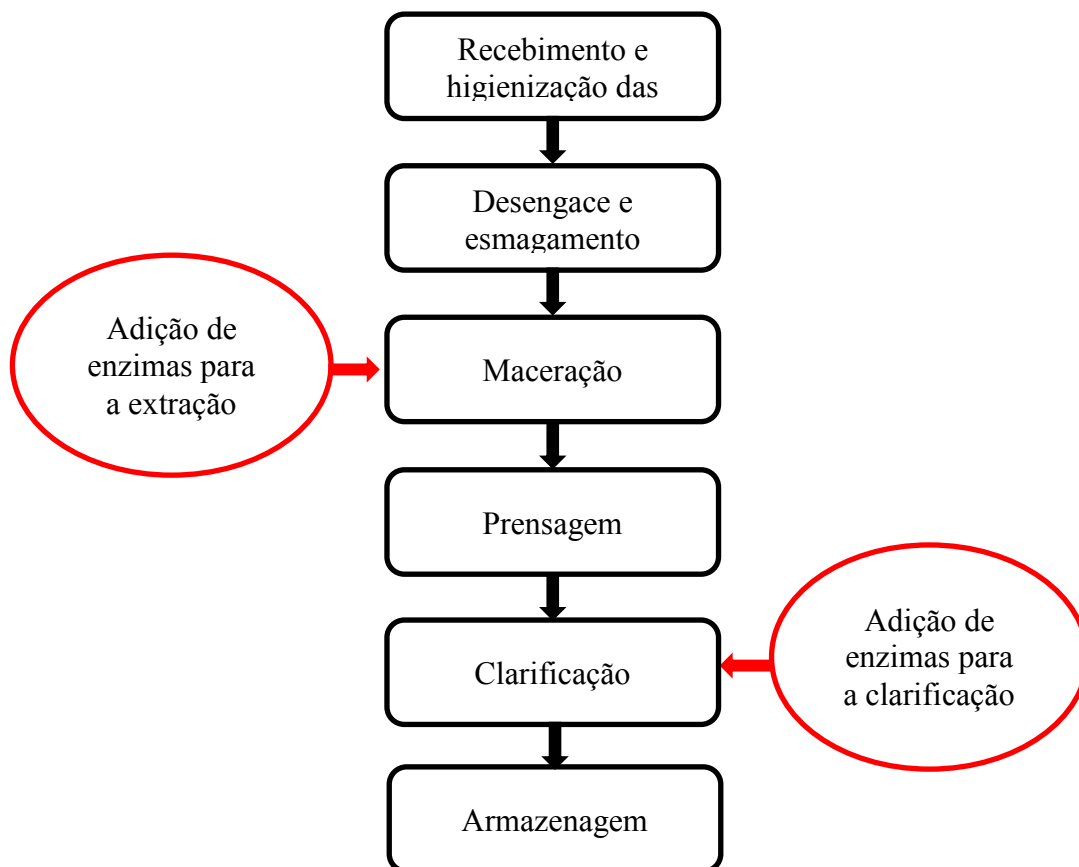
Whitaker, J. R. Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, p. 341-349, 1984.

Wilson, L.; Illanes, A.; Pessela, B. C. C.; Abian, O.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. Encapsulation of crosslinked penicillin G acylase aggregates in lentikats: Evaluation of a novel biocatalyst in organic media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, p. 558-562, 2004.

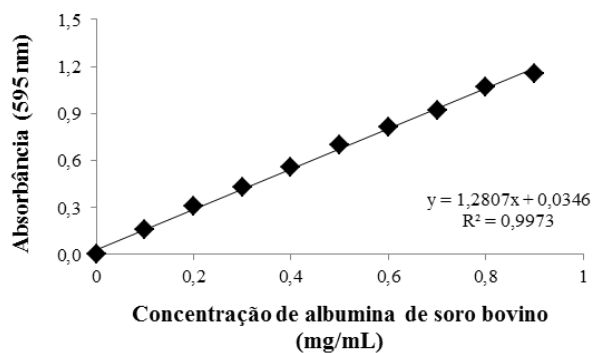
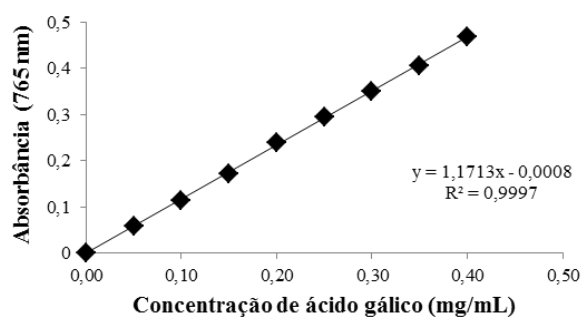
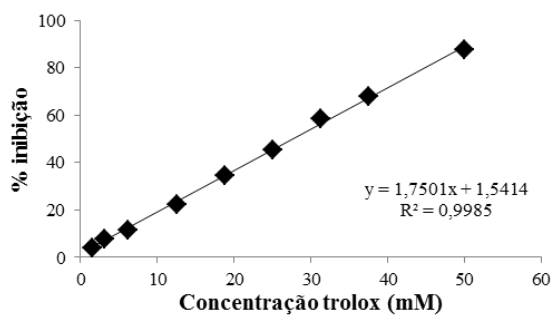
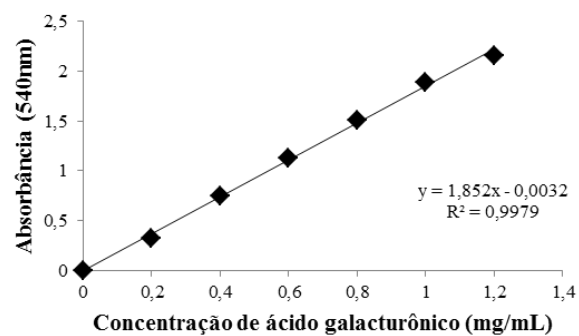
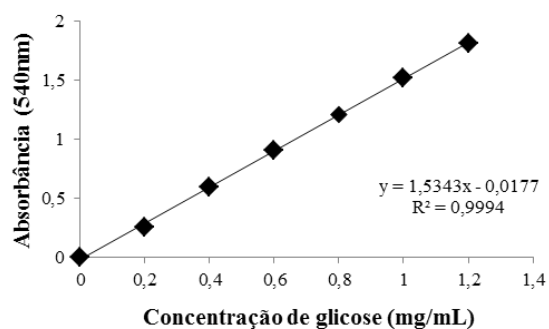
Wright, J.; Wyman, C.; Grohmann, K. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 18, p. 75-90, 1988.

Zoecklein, B. W.; Fugelsang, K. C.; Gump, B. H.; Nury, F. S. **Wine analysis and production**. The Chapman & Hall Enology Library. International Thompson Publishing, p. 621, 1995.

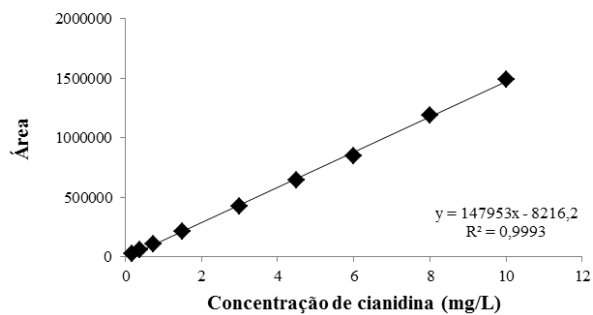
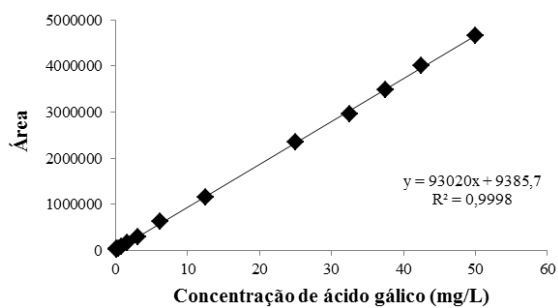
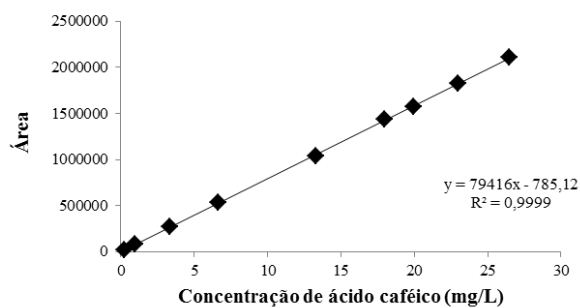
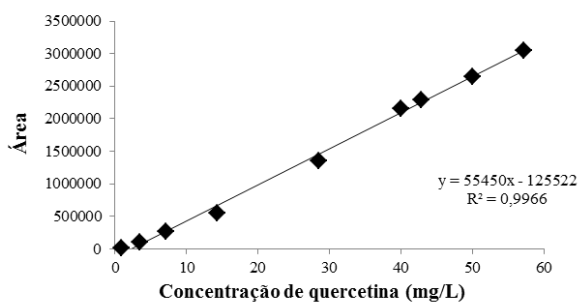
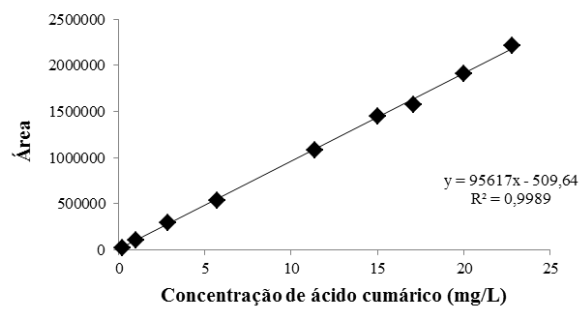
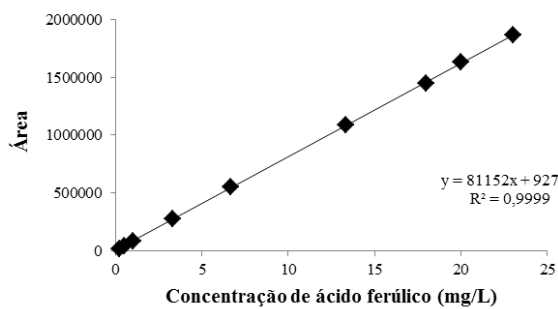
Zunino, S. Type 2 Diabetes and Glycemic Response to Grapes or Grape Products. **The Journal of Nutrition**, v. 139, p. 1794-1800, 2009.

**APÊNDICE A – Fluxograma da produção de suco de uva.**

**APÊNDICE B – Curvas analíticas para determinação das atividades enzimáticas, açúcares, capacidade antioxidante e proteínas.**



## APÊNDICE C – Curvas analíticas para quantificação dos compostos fenólicos por HPLC-DAD.





**APÊNDICE D – Determinação das atividades enzimáticas na condição de plena atividade das enzimas.**

