



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

**AVALIAÇÃO DO USO DO ULTRASSOM NA EXTRAÇÃO DO MOSTO DA UVA
CABERNET SAUVIGNON E NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

Luíza Merlini Garcia Dalagnol

Porto Alegre

2017

LUÍZA MERLINI GARCIA DALAGNOL

**AVALIAÇÃO DO USO DO ULTRASSOM NA EXTRAÇÃO DO MOSTO DA UVA
CABERNET SAUVIGNON E NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues

Co-orientador: Prof. Dr. Vitor Manfroi

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Dalagnol, Luíza Merlini Garcia
AVALIAÇÃO DO USO DO ULTRASSOM NA EXTRAÇÃO DO
MOSTO DA UVA CABERNET SAUVIGNON E NA ATIVIDADE
ENZIMÁTICA / Luíza Merlini Garcia Dalagnol. -- 2017.
134 f.

Orientador: Rafael Costa Rodrigues.
Coorientador: Vitor Manfroi.

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, 2017.

1. Extração enzimática. 2. Ultrassom. 3. Uva. 4.
Enzimas. I. Rodrigues, Rafael Costa, orient. II.
Manfroi, Vitor, coorient. III. Título.

DISSERTAÇÃO

AVALIAÇÃO DO USO DO ULTRASSOM NA EXTRAÇÃO DO MOSTO DA UVA CABERNET SAUVIGNON E NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Luíza Merlini Garcia Dalagnol

Tecnóloga em Viticultura e Enologia – Instituto Federal do Rio Grande do Sul

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de:

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

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

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

Pela Comissão examinadora:

Por:

Prof. Dr. Rafael C. Rodrigues
Orientador / Docente do Instituto de
Ciência e Tecnologia de Alimentos
PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. Adriano Brandelli
Coordenador do Programa de
Pós Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Co-orientador / Diretor do Instituto de
Ciência e Tecnologia de
Alimentos/UFRGS

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Diretor do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos/UFRGS

Prof.^a Dr.^a Rosane Rech
Banca / Docente do Instituto de
Ciência e Tecnologia de Alimentos
PPGCTA/UFRGS

Prof.^a Dr.^a Claucia F. V. de Souza
Banca / UNIVATES

Prof.^a Dr.^a Manuela Poletto Klein
Banca / UFCSPA

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, aos meus familiares, por todo apoio, compreensão, afeto e incentivo para realização do mestrado.

Em especial ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues, pelo voto de confiança, disponibilidade e dedicação na minha orientação, assim como por todo conhecimento transmitido para o desenvolvimento do trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Vitor Manfroi, por ter aberto os caminhos do ICTA e ter acreditado em mim, bem como pela orientação.

Á todos os professores e funcionários do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, por contribuírem com a minha formação intelectual, em especial aos professores, Plinho F. Hertz, o qual foi essencial para eu estar onde estou, e ao prof. Eliseu Rodrigues por ter dedicado seu tempo, e contribuído com o trabalho.

Á todos os colegas do PPGCTA, especialmente ao Lucas e a Micheli, os quais foram essenciais desde o início, compartilhando conhecimento, amizade e insanidade. Aos bolsistas, Vitória e Halisson, por toda dedicação e colaboração para realização dos experimentos, e à todos os demais colegas do grupo de Biotecnologia, Bioprocessos e Biocatálises, o quais contribuíram para o enriquecimento do trabalho.

Á Capes e a UFRGS pelo suporte financeiro.

E a todos os demais que fizeram parte de alguma forma desta etapa que se conclui. Cada um teve um papel essencial para eu chegar até aqui.

Gratidão!

RESUMO

O processamento da uva para produção de suco e vinho engloba diferentes processos tecnológicos, como por exemplo, o tratamento enzimático, onde usualmente são utilizadas preparações de enzimas comerciais, buscando-se aprimorar processos como clarificação e extração. Entretanto, esse é um tratamento que demanda elevado tempo de processamento, sendo relevante a busca por novas tecnologias a fim de apurar o processo. O ultrassom pode ser utilizado como uma alternativa para reduzir o tempo de processamento e acrescer qualidade ao produto, pois além de ser uma técnica sustentável, pode proporcionar benefícios no uso combinado com enzimas, favorecendo as reações em decorrência de seus efeitos. Neste trabalho, o uso em conjunto de tratamento enzimático (ET), ultrassom (US), e agitação mecânica (MS) foi avaliado na extração do mosto da uva Cabernet Sauvignon, a fim de compreender os efeitos das técnicas combinadas. Inicialmente, nove preparados enzimáticos comerciais foram caracterizados segundo suas atividades enzimáticas e aplicados para extração do mosto, avaliando a variação de temperatura (40, 50 e 60 °C), tempo (15 e 30 min), e concentração de enzima (0,01 a 2,0 U.g⁻¹). Os melhores resultados foram obtidos com o preparado Zimopec PX5® nas condições de 1,0 U.g⁻¹ de pectinase a 50 °C por 30 min. A extração do mosto apresentou aumento significativo nos parâmetros de qualidade avaliados (cor, sólidos solúveis totais, rendimento de extração, capacidade antioxidante, antocianinas totais) quando os três métodos de extração (US, MS e ET) foram combinados, principalmente na presença do ultrassom. Tendo em vista o efeito sinérgico obtido entre a aplicação enzimática e o ultrassom na extração do mosto, um novo estudo foi conduzido buscando investigar a influência da sonicação na eficiência catalítica das enzimas pectinase (PE), xilanase (XLN) e celulase (CE). Para isso, as atividades enzimáticas foram avaliadas em diferentes pHs e em amostras de enzima e substratos submetidas a um tratamento prévio de sonicação por tempos determinados (0 – 30 min). Os parâmetros cinéticos e termodinâmicos foram estimados, apresentando um efeito positivo do US na atividade das enzimas. A sonicação prévia do substrato contribuiu significativamente para o aumento da atividade de XLN, enquanto a sonicação prévia da enzima melhorou a atividade da CE e PE. Os resultados apresentaram um aumento na velocidade de hidrólise das enzimas com o uso do US, assim como um aumento da eficiência catalítica (V_{max}/K_m), mostrando o potencial da aplicação do US para ativação das enzimas. De acordo com os resultados obtidos, pode-se afirmar que o ultrassom proporcionou melhorias na extração do mosto, podendo ser utilizado como uma técnica alternativa de processo, bem como apresentou efeitos benéficos sobre as atividades enzimáticas.

Palavras-chave: Enzima. Extração. Pectinase. Celulase. Xilanase. Uva. Ultrassom.

ABSTRACT

Grape processing for juice and wine production encompasses different technological processes, such as enzymatic treatment, that usually uses commercial enzyme preparations to improve clarification and extraction processes. However, this is a treatment that demands high processing time, being relevant the search for new technologies in order to improve the whole process. Ultrasound (US) can be used as an alternative to reduce the processing time and improve the quality of the product, moreover, it can provide benefits in the combined use with enzymes, favoring the enzymatic reactions. In this work, the combined use of enzymatic treatment (ET), ultrasound (US), and mechanical agitation (MS) was studied in order to understand the effects of the techniques on Cabernet Sauvignon must extraction. Initially, nine commercial enzyme preparations were characterized according to their enzymatic activities and applied to must extraction, evaluating temperature (40, 50 and 60 °C), time (15 and 30 min), and enzyme concentration (0.01 to 2.0 U.g⁻¹). The best results were obtained for the preparation Zimopec PX5® under conditions of 1.0 U.g⁻¹ of pectinase at 50 °C for 30 min. A significant increase on quality parameters (color, °Brix, yield, antioxidant capacity, total anthocyanins) was obtained to extraction combining the three methods (US, MS and ET), mainly when US were applied. Based on these previous results, a new study was conducted to investigate the influence of sonication on the catalytic efficiency of the enzymes pectinase (PE), xylanase (XLN) and cellulase (CE). The enzymatic activities were evaluated at different pH and in samples of enzyme and substrates submitted to a previous treatment of sonication by determined times (0 - 30 min). The kinetic and thermodynamic parameters were estimated, showing a positive effect of the ultrasonic treatment on the enzymatic activity. Previous sonication of the substrate contributed significantly to the increase in XLN activity, whereas the previous sonication of the enzyme improved the activity of CE and PE. This research showed the potential benefits of ultrasound treatment on reaction rate and catalytic efficiency (V_{max}/K_m) improvement of enzymes, attesting that US can be used to increase the catalytic efficiency of pectinase, xylanase and cellulase enzymes. According to the obtained results, it can be affirmed that ultrasound improved the extraction process, and can be applied as an alternative technique, as well as provided beneficial effects on the enzymatic activity.

Keywords: Enzyme. Extraction. Pectinase. Cellulase. Xylanase. Grape. Ultrasound.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplos de uva e seus derivados.....	20
Figura 2 – Representação do vinho e uva da variedade Cabernet Sauvignon.	21
Figura 3 – Estrutura dos principais compostos fenólicos.	24
Figura 4 – Estruturas químicas de alguns flavonoides encontrados na natureza.....	24
Figura 5 – Estrutura molecular da antocianidina e representação de alguns radicais com potencial para se ligarem a molécula.	26
Figura 6 – Representação esquemática da parede celular vegetal.....	27
Figura 7– Esquema estrutural dos principais componentes da parede celular primária.	27
Figura 8 – Estrutura das duas principais frações da pectina, homogalactorona (a) e ramnogalacturona (b).	28
Figura 9 – Moléculas de glicose ligadas entre si por ligação glicosídica do tipo β -1,4.	29
Figura 10 – Modelo estrutural de uma microfibrila de celulose.	30
Figura 11 – Principais açúcares ligados à cadeia da pectina e hemicelulose.	31
Figura 12 – Modelo estrutural de uma cadeia de xilana.	32
Figura 13 – Modelo da estrutura enzimática e ligação enzima-substrato.....	33
Figura 14 – Ação da pectinase sob estrutura química da cadeia de pectina.	39
Figura 15 – Ação das pectinases em uma molécula de pectina.....	40
Figura 16 – Ação das principais celulases sob a cadeia de celulose.	42
Figura 17 – Hidrólise enzimática da cadeia de xilana pelo complexo das xilanases.	43
Figura 18 – Modelo de ação das enzimas celulases, hemicelulases e pectinases sob seus substratos.	44
Figura 19 – Fluxograma dos experimentos de extração do mosto.....	62

CAPÍTULO III – ARTIGO I – Combination of ultrasound, enzymes and mechanical stirring: a new method to improve *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon must yield, quality and bioactive compounds.

Fig. 1. Reducing capacity (RC) of grape must treated with nine enzyme preparation at different temperatures for (A) US, and (B) MS. *Black*, 40 °C; *Gray*, 50 °C for 15 min; *Light Gray*, 50 °C for 30 min; *Dark Gray*, 60 °C.....87

Fig. 2. Extraction yield (A) and °Brix (B) of grape must extracted on MS with different enzyme concentrations for the enzymatic preparations: (■) Zimopec PX5; (●) Lallzyme Beta; (△) Pectinex Ultra Clear.88

CAPÍTULO IV – ARTIGO II – Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters.

Fig 1 – Evaluation of (a) pectinase, (b) xylanase and (c) cellulase activity with different pH values at (■) ultrasound or (○) stirring bath. 106

Fig 2 – Evaluation of (a) pectinase (37 °C; pH 4.8), (b) xylanase (50 °C; pH 5) and (c) cellulase (50 °C; pH 4.8) activity combining the pre-sonication of enzyme and/or substrate. (■) Enzyme solution pre-sonicated - activity measured on US; (●) Enzyme solution pre-sonicated - activity measured on MS; (□) Substrate solution pre-sonicated - activity measured on US; (○) Substrate solution pre-sonicated - activity measured on MS. 108

Fig 3 – Michaelis–Menten plots for (a) pectinase, (b) xylanase and (c) cellulase. (■) Enzyme activity on US; (○) Enzyme activity on MS. 111

Fig 4 – Effect of temperature on the enzyme activity of (a) pectinase; (b) xylanase and (c) cellulase on (■) ultrasound and (○) mechanical stirring bath. 114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistema de classificação das enzimas.	34
Tabela 2 - Principais enzimas, atividades e microrganismo declarado pelos fabricantes.....	60
Tabela 3 - Protocolos de extração para extração do mosto de uva.	62

CAPÍTULO III – ARTIGO I – Combination of ultrasound, enzymes and mechanical stirring: a new method to improve *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon must yield, quality and bioactive compounds.

Table 1: Extraction protocols for grape must extraction.	80
Table 2: Enzymatic activities for each enzyme preparation.....	84
Table 3: Effect of temperature on yield, total soluble solids, and reducing capacity of grape must treated with nine commercial enzymatic preparations (EP) at mechanical stirring (MS) and ultrasound extraction (US).	86
Table 4: Physicochemical analysis of grape must extracted with mechanical stirring (MS) and ultrasound (US) via different extraction methods.	89
Table 5: Analysis of antioxidant capacity for grape must extracted with mechanical stirring (MS) and ultrasound (US) techniques.....	90
Table 6: Color parameters for grape must extracted with mechanical stirring (MS) and ultrasound (US).	90
Table 7: Anthocyanin concentration for grape must extracted with mechanical stirring (MS) and ultrasound (US).....	92

CAPÍTULO IV – ARTIGO II – Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters

Table 1 – Enzymatic kinetic parameters of pectinase, xylanase and cellulase hydrolysis reactions with (US) or without (SB) ultrasound treatment (mean \pm SD)..	110
Table 2 – Thermodynamics parameters for pectinase, xylanase and cellulase hydrolysis reactions with (US) or without (SB) ultrasound treatment (mean \pm SD)..	113

LISTA DE SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
CE	Celulase
E_a	Energia de ativação
K_m	Constante de Michaelis
MS	Agitação mecânica
PE	Pectinase
PG	Poligalacturonase
PL	Pectinaliase
PMGE	Pectinametilesterase
RC	Capacidade redutora
TSS	Sólidos solúveis totais
US	Ultrassom
V_{max}	Velocidade máxima da reação
XLN	Xilanase
ΔG	Energia livre de Gibbs
ΔH	Entalpia
ΔS	Entropia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
	CAPÍTULO I	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	UVA E DERIVADOS.....	20
2.1.1	Técnicas de extração de compostos.....	22
2.2	COMPOSTOS FENÓLICOS.....	23
2.2.1	Antocianinas.....	25
2.3	ESTRUTURA DA CÉLULA VEGETAL	26
2.3.1	Pectina	28
2.3.2	Celulose	29
2.3.3	Hemicelulose	31
2.3.3.1	<i>Xilana</i>	32
2.4	ENZIMAS.....	33
2.4.1	Fatores externos que afetam a atividade enzimática.....	35
2.3.2	Cinética enzimática.....	36
2.4.3	Modelo cinético de Michaelis-Menten	37
2.4.4	Parâmetros termodinâmicos enzimáticos	37
2.4.5	Pectinases	38
2.4.6	Celulases	41
2.4.7	Xilanases.....	42
2.4.8	Aplicação de enzimas para extração de compostos da uva	43
2.5	ULTRASSOM	46

2.5.1	Efeitos do ultrassom.....	47
2.5.2	Uso de ultrassom e enzimas para processos de extração	48
2.5.2.1	<i>Efeitos do ultrassom na enzima</i>	49
2.6	REFERÊNCIAS CAPÍTULO I	51
	CAPÍTULO II	59
3	MATERIAL E MÉTODOS	59
3.1	MATERIAL.....	59
3.1.1	Uva	59
3.1.2	Enzimas	59
3.1.3	Reagentes	60
3.2	EQUIPAMENTOS.....	60
3.3	EXTRAÇÃO DO MOSTO DE UVA	61
3.3.1	Estudo dos parâmetros e protocolos de extração	61
3.4	DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA ENZIMÁTICA	63
3.5	ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS TERMODINÂMICOS	63
3.6	INFLUÊNCIA DO pH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	64
3.7	PRÉ-SONICAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE ENZIMA E SUBSTRATO.....	64
3.8	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	65
3.8.1	Determinação da atividade enzimática	65
3.8.1.1	<i>Atividade de pectinase total</i>	65
3.8.1.2	<i>Atividade de poligalacturonase</i>	66
3.8.1.4	<i>Atividade de xilanase</i>	67
3.8.1.5	<i>Atividade de pectinálise</i>	68

3.8.1.6	<i>Atividade de pectinametilesterase</i>	68
3.8.2	Cálculo do rendimento de extração	69
3.8.3	Determinação dos sólidos solúveis totais	69
3.8.4	Açúcares redutores	69
3.8.5	Acidez total	70
3.8.6	pH	70
3.8.7	Capacidade redutora	70
3.8.8	Atividade antioxidante	71
3.8.9	Determinação parâmetros de cor	71
3.8.10	Análise de compostos fenólicos por HPLC-DAD-MS	72
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	72
3.10	REFERÊNCIAS CAPÍTULO II	73
CAPÍTULO III		74
4	ARTIGO I	74
1	INTRODUCTION	77
2	MATERIAL AND METHODS	79
2.1	CHEMICALS.....	79
2.2	SAMPLE	79
2.3	ENZYMATIC ACTIVITIES	79
2.4	GRAPE MUST EXTRACTION.....	80
2.4.1	Study of extraction parameters	80
2.4.2	Determination of the extraction protocol	80
2.5	ANALYTICAL METHODS.....	81

2.5.1	Extraction yield	81
2.5.2	Reducing sugars, soluble solids, acidity and pH	81
2.5.3	Antioxidant Capacity.....	81
2.5.4	Determination of color properties.....	82
2.5.5	Determination of phenolic compounds.....	82
2.6	STATISTICAL ANALYSIS	83
3	RESULTS AND DISCUSSION.....	84
3.1	Enzymatic activity	84
3.2	Effects of extraction conditions on grape must parameters	85
3.3	Extraction protocols.....	88
3.3.1	<i>Physicochemical analysis and color attributes</i>	<i>88</i>
3.3.2	<i>Phenolic compounds and anthocyanins</i>	<i>91</i>
4	CONCLUSION	94
	REFERENCES.....	95
	CAPÍTULO IV.....	98
5	ARTIGO II.....	98
1	INTRODUCTION	101
2	MATERIAL AND METHODS	102
2.1	Chemicals.....	102
2.2	Enzymatic activities	102
2.2.1	Determination of pectinase activity.....	103
2.2.2	Determination of xylanase activity	103

2.2.3	Determination of cellulase activity	103
2.3	Equipment.....	103
2.4	Effect of pH on enzymes activities under US.....	104
2.5	Effect of sonication on enzyme and substrate solution.....	104
2.6	Enzymatic Kinetics	104
2.7	Thermodynamic parameters.....	105
2.8	Statistical analysis	105
3	RESULTS AND DISCUSSION.....	106
3.1	Effect of pH on enzymes activity under sonication	106
3.2	Effects of sonication on enzyme and substrate solution.....	108
3.3	Effects of sonication on enzymatic kinetics	110
3.4	Effects of ultrasound on the thermodynamic parameters	112
4	CONCLUSION	116
	REFERENCES.....	117
	CAPÍTULO V.....	121
6	DISCUSSÃO GERAL.....	121
7	CONCLUSÃO	127
	APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR ARTIGO I.....	129
	APÊNDICE B – MATERIAL SUPLEMENTAR ARTIGO II.....	134

1 INTRODUÇÃO

A variedade de uva Cabernet Sauvignon, originária da região de Bordeaux na França, é a uva vinífera mais difundida no mundo e produz vinhos de excelente qualidade (RIZZON; MIELE, 2002). Pertencente à família das Vitaceae, a uva (*Vitis vinifera*) é uma das frutas mais produzidas e comercializadas mundialmente devido a sua grande versatilidade de consumo, valor econômico, e por ser fonte de nutrição e saúde. Na uva e em seus derivados são encontrados grandes quantidades de compostos bioativos denominados de polifenóis, os quais vêm sendo relacionados a diversos efeitos benéficos para saúde humana, como na proteção contra doenças coronarianas, cardiovasculares e câncer (RITSCHER; QUECINI, 2014).

Os principais polifenóis encontrados nas uvas são os flavonoides, grupo ao qual pertencem as antocianinas e os flavonóis; os estilbenos (resveratrol); e uma larga variedade de taninos (FRANCIS, 2000). Estes compostos, importantes componentes das uvas, são essenciais para garantir a qualidade do vinho, sendo responsáveis pela adstringência e cor dos tintos, assim como pelos tons amarelados e aromas dos vinhos brancos, porém, muitos dos constituintes sensorialmente ativos no vinho não estão presentes nas uvas e são formados ao longo do processamento por transformações bioquímicas catalisadas por enzimas específicas (UGLIANO, 2009).

O processo de extração é uma das etapas mais importantes da produção de vinhos e sucos, onde geralmente são adicionados preparados enzimáticos de pectinases visando aumentar o rendimento, e melhorar a extração de cor e outros compostos. Grande parte dos preparados utilizados apresentam atividades secundárias, como de celulases, hemicelulases, proteases, entre outras, as quais possuem a capacidade de degradar outros polissacarídeos vegetais presentes no meio (FUGELSANG; EDWARDS, 2006; LIEU, 2010).

Diferentes técnicas pré-fermentativas são utilizadas durante o processamento da uva para produção de vinho. Alguns processos, como a termomaceração, utilizam calor (< 70 °C) para melhorar a extração de compostos, como taninos e cor. No entanto, a alta temperatura aplicada por longo período (6 – 12 h), ocasiona a

degradação em demasia de alguns compostos termolábeis. Os processos pré-fermentativos assistidos por tratamento enzimático oferecem uma gama de vantagens em relação à qualidade do produto, no entanto, o tempo de processamento ainda é longo, podendo ocasionar elevados gastos em energia, tendo em vista que o controle de temperatura é necessário por longos períodos (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

Ultimamente, novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas e aplicadas na indústria em busca de aprimorar alguns processos. O ultrassom (US) é uma alternativa sustentável que vem sendo aplicada em diversas áreas e visa apurar processos bioquímicos, físicos e tecnológicos da indústria. Ele oferece uma gama de vantagens em termos de produtividade, rendimento e seletividade, com redução do tempo de processamento, melhoria da qualidade e garantia da segurança de alguns produtos alimentícios (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011).

Os principais efeitos do ultrassom são decorrentes da cavitação, a qual proporciona uma maior penetração do solvente nas células e melhor transferência de massa (MOHOLKAR; NIERSTRASZ; WARMOESKERKEN, 2003). Porém, os efeitos do US são fortemente dependentes da sua intensidade e duração (ZHU, 2015). A combinação de alta intensidade, tempo e temperatura geram efeitos químicos, com a formação de radicais livres que alteram as condições do meio, levando a inativação de enzimas (MAWSON et al., 2011). Resultados controversos sobre a eficiência dos tratamentos de US e enzima combinados foram obtidos. Por um longo período, o ultrassom foi utilizado como um método para inativação enzimática (FACHIN et al., 2003; MAWSON et al., 2011), no entanto, alguns estudos recentes têm mostrado que o ultrassom pode agir benéficamente à enzima, melhorando sua atividade (DELGADO-POVEDANO; LUQUE DE CASTRO, 2015; ISLAM; ZHANG; ADHIKARI, 2014; WANG et al., 2015).

Tendo em vista os possíveis benefícios que o ultrassom pode trazer ao processo pré-fermentativo e na eficiência das enzimas, esse trabalho teve como objetivos avaliar os efeitos do ultrassom combinado com o tratamento enzimático e agitação mecânica na extração do mosto da uva Cabernet Sauvignon, e estudar a

influência do ultrassom na atividade das principais enzimas envolvidas no processo: pectinase (PE), xilanase (XLN) e celulase (CE).

Os objetivos específicos do estudo foram:

- Caracterizar e avaliar nove preparados enzimáticos comerciais para extração do mosto da uva;
- Testar a combinação de diferentes técnicas na extração do mosto (ultrassom, agitação mecânica e tratamento enzimático);
- Avaliar os efeitos do ultrassom no rendimento, parâmetros físico-químicos e compostos bioativos na extração do mosto;
- Estudar a influência do ultrassom em diferentes pH na atividade enzimática da pectinase, celulase e xilanase;
- Estudar a influência do ultrassom na atividade enzimática da pectinase, celulase e xilanase em diferentes temperaturas;
- Avaliar o efeito da aplicação prévia de ultrassom no substrato e na enzima;
- Determinar os parâmetros cinéticos e termodinâmicos das reações tratadas por ultrassom.

Este trabalho encontra-se organizado em 5 Capítulos. No Capítulo 1, está apresentada a revisão bibliográfica abordando os principais assuntos do tema proposto. O Capítulo 2 apresenta de forma detalhada a metodologia utilizada para realização dos experimentos. Os resultados obtidos estão apresentados no formato de artigos científicos nos Capítulos 3 e 4, conforme foram submetidos à publicação. No Capítulo 5, encontram-se a discussão geral, seguida das principais conclusões obtidas neste trabalho.

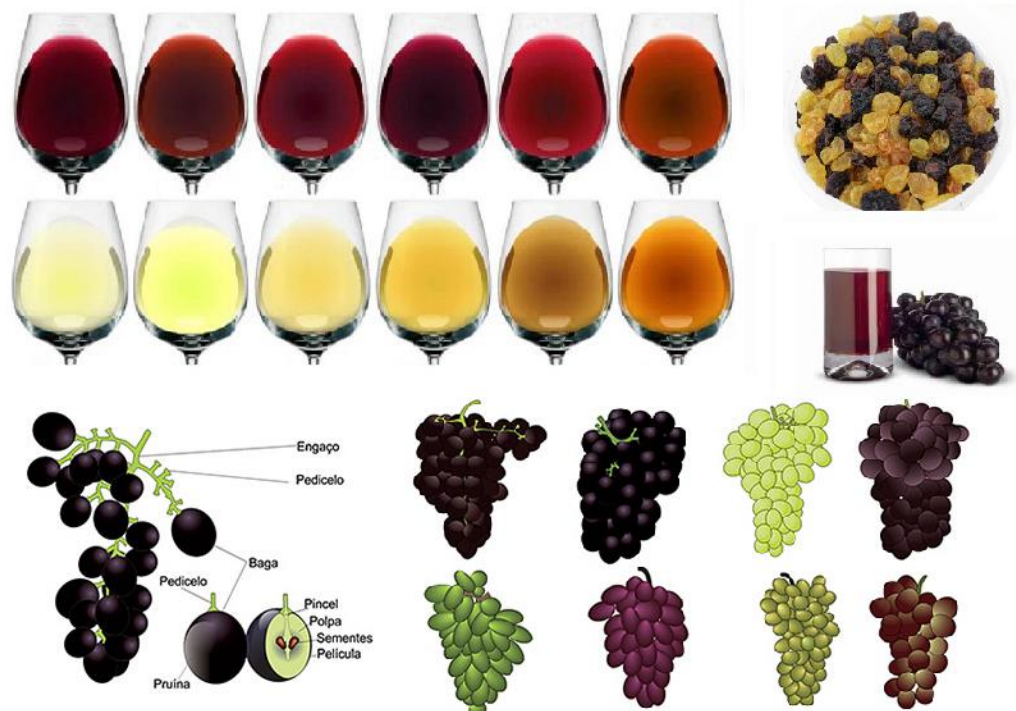
CAPÍTULO I

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 UVA E DERIVADOS

A uva pertence ao gênero *Vitis* da Família Vitaceae, o qual apresenta mais de 1000 espécies destinadas a diferentes formas de consumo e processamento, como a própria fruta *in natura* ou seca, ou processada para elaboração de vinho, suco ou conservas (Figura 1). O vinho é elaborado a partir de uvas europeias pertencentes à espécie *Vitis vinifera*, já os sucos, são obtidos pelo processamento de uvas americanas e híbridas, pertencentes a outras espécies do gênero *Vitis* ou resultado do cruzamento entre elas (CAMARGO, 2005). Do ponto de vista nutricional, os derivados da uva são equivalentes à própria fruta, pois em sua composição estão presentes os principais constituintes, como: açúcares, minerais, ácidos, vitaminas e compostos fenólicos (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

Figura 1 – Exemplos de uva e seus derivados.



Fonte: Adaptado de Vinitude, 2013.

Uma das principais formas de processamento da uva é através da elaboração de vinho e suco, devido às facilidades do processo e elevado valor nutricional vinculado a eles. O suco é obtido através da separação da fração sólida e líquida do mosto de uva por meio da prensagem dos cachos, podendo ser elaborado de diversas variedades de uva, especialmente com uvas americanas, as quais apresentam melhores características tecnológicas para a produção de suco (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). Já o vinho, é a bebida obtida a partir da fermentação alcoólica do mosto da uva, e são classificados em tintos, brancos, e espumantes, cada qual elaborado por um método específico. Em geral, a fabricação do vinho inclui os processos de: esmagamento das uvas, maceração, fermentação, filtração e engarrafamento. Como auxiliares de processo são utilizados alguns aditivos químicos como, sulfitos, agentes antioxidantes, ativantes, nutrientes, clarificantes, enzimas, estabilizantes, entre outros (GIOVANINNI; MANFROI, 2009).

A uva Cabernet Sauvignon (Figura 2) pertencente à espécie *Vitis vinifera* é a uva vinífera mais difundida no mundo, produzindo vinhos de excelente qualidade. É originária da região de Bordeaux, França, resultado do cruzamento entre as uvas cv. Cabernet Franc e cv. Sauvignon Blanc (RIZZON; MIELE, 2002).

Figura 2 – Representação do vinho e uva da variedade Cabernet Sauvignon.



Fonte: Adaptado de Wine Folly.

Ao redor do mundo são encontradas diversas variedades de uvas, cada qual com suas características específicas quanto ao valor nutricional e propriedades tecnológicas. Todavia, a uva é considerada uma das maiores fontes de compostos fenólicos, possuindo em sua grande maioria compostos não-flavonoides na polpa e

flavonoides na casca, semente e engaço, os quais apresentam grande potencial antioxidante e são responsáveis por minimizar processos oxidativos do organismo (CAMARGO, 2005).

2.1.1 Técnicas de extração de compostos

Uma das etapas mais importantes na elaboração de vinhos tintos é a maceração, a qual corresponde ao período em que o mosto permanece em contato com a parte sólida da uva, e os compostos da película são extraídos através de dissolução e difusão, atribuindo cor (antocianinas) e estrutura (taninos, minerais, polissacarídeos) ao vinho (GUERRA, 2003). O grau de extração, e a quantidade desses compostos presentes no mosto são determinados pela natureza dos seus constituintes, concentração e localização na baga de uva, métodos de processamento utilizados; incluindo temperatura, tempo de duração e solubilidade dos compostos; assim como variam em função da variedade, do grau de maturação e do estado sanitário da uva, fatores estes influenciados pelas condições naturais do ambiente e safra (FLANZY, 2003).

Previamente ao processo de maceração é necessária a realização do esmagamento da uva, a fim de romper a película da baga e aumentar a superfície de contato do mosto, facilitando a dissolução dos compostos. O processo de maceração tradicional ocorre geralmente concomitantemente à fermentação alcoólica, porém, é possível realiza-la de forma independente utilizando diferentes técnicas, como a maceração após a fermentação alcoólica, ou em período pré-fermentativo, incluindo técnicas como a termomaceração, maceração carbônica e maceração a frio. Independentemente da técnica utilizada, a extração dos componentes nobres da película, especialmente os compostos fenólicos e os aromas é desejada (RIZZON; DALL'AGNOL, 2007).

A maceração pré-fermentativa a frio, também conhecida como criomaceração, consiste em resfriar o mosto após o desengace e esmagamento da uva, para uma maior extração de compostos aromáticos, resultando em uma técnica que permite obter vinhos mais frutados e finos (RIBÈREAU-GAYON, DUBOURDIEU; LONVAUD, 2006).

O processo de maceração carbônica é uma técnica utilizada para vinhos tintos, onde os grãos não são esmagados e a maceração transcorre em um ambiente anaeróbico, sob atmosfera saturada de gás carbônico. Essa técnica é recomendável para uvas inteiras, saudáveis, com baixo teor de taninos e elevada concentração de ácido málico, açúcar e antocianinas (USSEGLIO-TOMASSET, 1986). Nesse processo, a baga sofre uma fermentação intracelular, onde o ácido málico é transformado em álcool etílico e em outras substâncias (FLANZY, 2003).

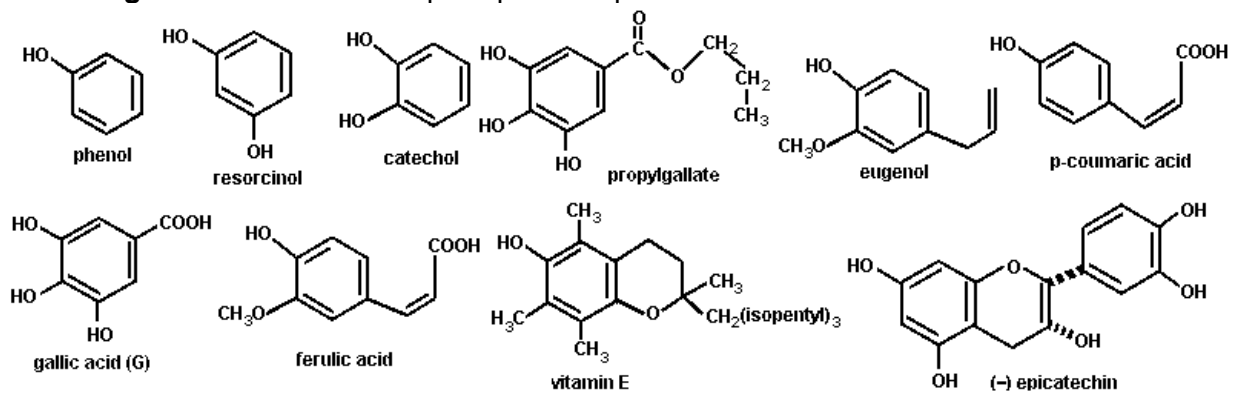
A termovinificação é uma técnica pré-fermentativa indicada para uvas tintas com pouca matéria corante e sanidade deficiente (RIBÈREAU-GAYON, DUBOURDIEU; LONVAUD, 2006). O processo consiste na extração á quente de compostos fenólicos e precursores aromáticos da uva, onde o mosto é aquecido a 60 - 75 °C por 6 - 12 h, e depois arrefecido para início da fermentação. O domínio de controle sobre a temperatura e tempo de maceração permite adaptar a técnica à diferentes estilos de vinho, podendo-se obter a diminuição do caráter vegetal indesejável, inativação de enzimas oxidativas, e potencializar os aromas frutados de origem varietal (DAVAUX; OUBART, 2009).

2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos podem ser classificados como flavonoides e não-flavonoides, existindo também outras formas como os estilbenos (resveratrol) e os fenóis voláteis. Do ponto de vista químico, os compostos fenólicos (Figura 3) são caracterizados por apresentar um núcleo benzênico agrupado a um ou vários grupos hidroxila (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

Os compostos não-flavonoides compreendem os ácidos fenólicos, benzoicos e cinâmicos, e outros derivados fenólicos como os estilbenos. Os ácidos fenólicos, normalmente são encontrados em baixas concentrações, e representam um dos principais compostos nas uvas brancas (KANNER; FRANKEL; GRANIT, 1994). Nas uvas, os principais ácidos fenólicos encontrados são os ácidos hidroxicinâmicos, localizados nos vacúolos das células das películas e polpas (RIBÈREAU-GAYON, DUBOURDIEU; LONVAUD, 2006).

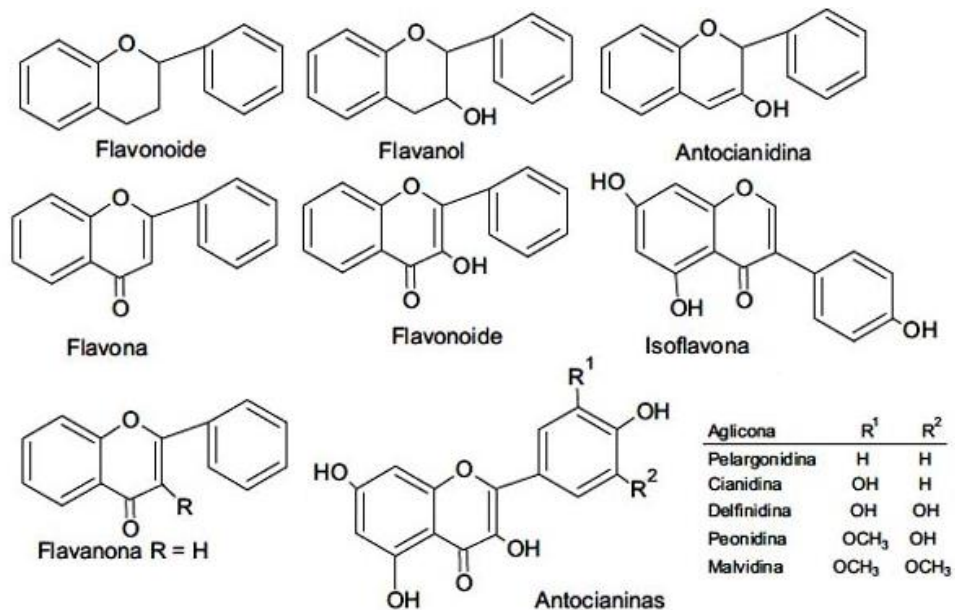
Figura 3 – Estrutura dos principais compostos fenólicos.



Fonte: Adaptado de TutorVista, 2017.

Os flavonoides, representados na Figura 4, compreendem os flavonóis, flavanóis e antocianinas, sendo os flavonóis importantes por atuarem na co-pigmentação das antocianinas (ANDERSEN; MARKHAM, 2006). Os flavonoides são os responsáveis pela cor das folhas e flores, sendo também encontrados em outras partes das plantas, onde desempenham diversas funções como: proteção contra a incidência de raios ultravioleta, proteção contra herbívoros e patógenos e atração de insetos polinizadores. Esses compostos também possuem propriedades farmacológicas importantes como atividades anti-inflamatória e antioxidante (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

Figura 4 – Estruturas químicas de alguns flavonoides encontrados na natureza.



Fonte: Sotero et al., 2011.

Os polifenóis totais correspondem ao conjunto de todos os compostos fenólicos presentes no meio, e são de grande importância uma vez que estão relacionados, direta ou indiretamente, com a qualidade do produto. Eles são os responsáveis pela cor, corpo e adstringência, inclusive pelas diferenças entre uvas ou vinhos, tintos e brancos, pela presença ou ausência de compostos como as antocianinas (PUÉRTOLAS et al., 2010; SINGLETON; ESAU, 1968).

Sua presença/concentração no produto final é dependente da tecnologia aplicada, bem como o tempo de contato com a casca, temperatura, emprego de enzimas, estágio de maturação, entre outros (VÁZQUEZ et al., 2010; SINGLETON; ESAU, 1968).

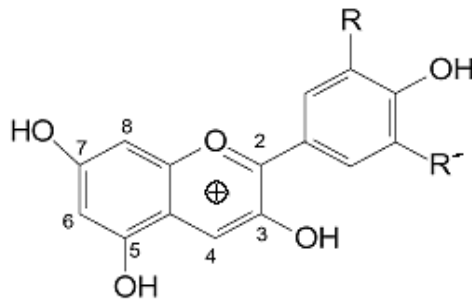
2.2.1 Antocianinas

As antocianinas são pigmentos naturais pertencentes ao grupo dos flavonoides, e são constituídas por dois anéis de benzeno e um anel central heterocíclico contendo oxigênio (KONG et al., 2003). Elas são responsáveis pela maioria dos tons de azul, violeta, e todas as tonalidades de vermelho que se encontram na natureza. Nas videiras, em algumas variedades, elas acumulam-se nas folhas durante a senescência, e são responsáveis pela coloração das cascas das uvas tintas, sendo encontradas também na polpa de algumas variedades de uvas tintas (FRANCIS, 2000; LIANG et al., 2008).

As antocianinas são glicosídeos de antocianidinas (agliconas), as quais são derivadas do cátion flavilium. Elas possuem um esqueleto de carbono C6-C3-C6 e apesar de possuir a mesma origem de outros flavonoides, se diferem por absorver luz em uma região visível do espectro (FRANCIS, 2000).

As principais formas de antocianidinas encontradas e seus possíveis radicais estão representados na Figura 5. Esses compostos se diferem entre si pelo número de grupos hidroxílicos, grau de metilação, e número de açúcares ligados à molécula, bem como quanto aos radicais que estão ligados ao açúcar da cadeia principal (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Figura 5 - Estrutura molecular da antocianidina e representação de alguns radicais com potencial para se ligarem a molécula.



Antocianidina (grupo OH em 7)	Grupo em R	Grupo em R'
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃
Pelargonidina	H	H
Peonidina	OCH ₃	H
Petunidina	OCH ₃	OH

Fonte: Terzi e Rossi, 2002.

Nas antocianinas, uma ou mais hidroxilas das posições 3, 5 e 7 estão ligadas a açúcares, como glicose, arabinose, galactose e ramnose, sendo sempre o C-3 glicosilado. Em muitos casos, os açúcares estão acilados a ácidos fenólicos, como os ácidos *p*-cumárico, cafeico e ferúlico. Os grupos R e R', açúcares e ácidos ligados à cadeia caracterizam os diferentes tipos de antocianinas (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

A propriedade mais descrita das antocianinas é sua ação antioxidante, que desempenha um papel importante na prevenção ou retardamento de várias doenças crônicas como câncer, doenças cardiovasculares, doença de Alzheimer (RISTCHEL; QUECINI, 2014).

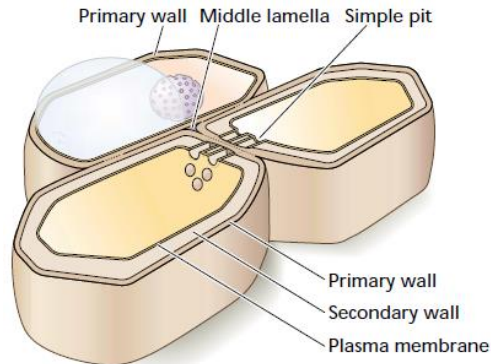
2.3 ESTRUTURA DA CÉLULA VEGETAL

As plantas são organismos multicelulares compostos por milhões de células com funções específicas, contendo núcleo, retículo endoplasmático, citoplasma, ribossomos, complexo de Golgi, mitocôndrias, lisossomos, plastos e vacúolos. A célula vegetal é envolta por uma parede celular que possui função de proteção, sustentação e regulação do volume celular (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

A parede celular, ilustrada na Figura 6, consiste em uma complexa mistura de polissacarídeos e outros polímeros organizados entre si unidos por ligação covalentes e não-covalentes. Ela pode ser classificada em: primária, formada por células de crescimento, principalmente por polissacarídeos como a celulose, hemicelulose e pectina; e secundária, a qual possui função estrutural, conferindo

estabilidade, e geralmente é constituída de polímeros de celulose e hemicelulose (TAIZ; ZEIGER, 2010).

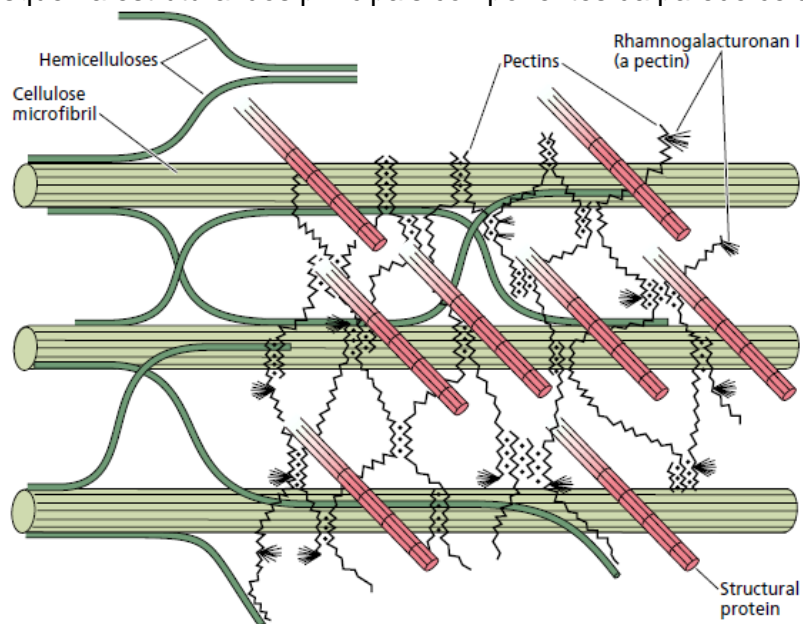
Figura 6 - Representação esquemática da parede celular vegetal.



Fonte: Taiz e Zeiger, 2010.

A parede celular primária (Figura 7) é composta de aproximadamente 25 % celulose, 25 % hemicelulose e 35 % de pectina, sendo as microfibrilas de celulose envoltas por uma rede super hidratada, o que confere força e flexibilidade à célula. Entretanto, a composição da parede celular varia muito conforme as espécies de planta. Além dos polissacarídeos, a parede celular vegetal contém diferentes tipos de proteínas, e uma fina camada conhecida como lamela média, a qual é responsável pela junção de duas células vizinhas, e geralmente é rica em pectina (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007; TAIZ; ZIEGER, 2010).

Figura 7- Esquema estrutural dos principais componentes da parede celular primária.



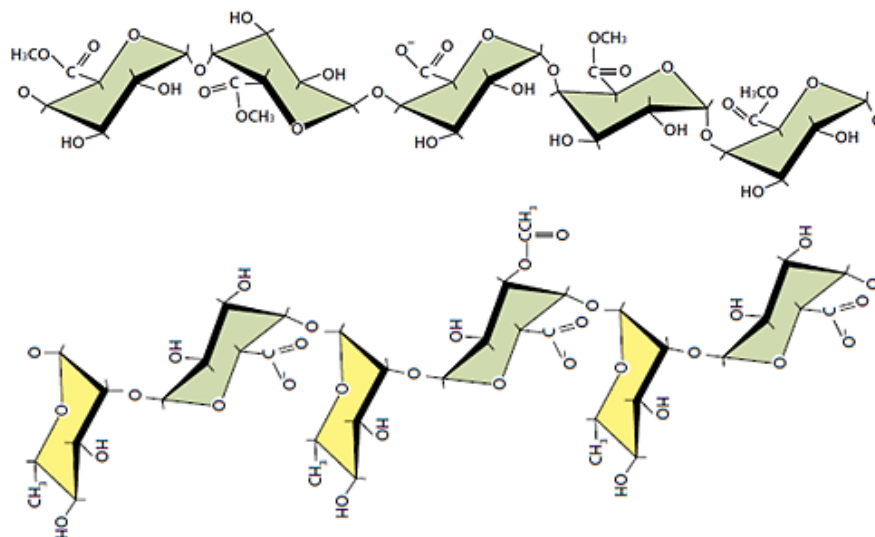
Fonte: Taiz e Zeiger, 2010.

2.3.1 Pectina

A pectina é um polissacarídeo de alto peso molecular, variante entre 30.000 - 70.000 kDa, encontrada na parede celular primária das células vegetais e nas camadas intercelulares (lamela média) (UENOJO; PASTORE, 2007). Quimicamente, é um complexo coloidal de polissacarídeos ácidos, composto de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações α -1,4, parcialmente esterificados por grupos metil (HIMMEL et al., 2007). A pectina é o polissacarídeo estrutural mais solúvel, e juntamente com a celulose, hemicelulose e lignina, contribui para a estrutura e integridade da parede celular, assim como mantem as ligações entre as células vegetais (UENOJO; PASTORE, 2007).

A estrutura principal das substâncias pécicas (Figura 8), 65 % da cadeia, é constituída por uma cadeia linear de monômeros de ácido D-galacturônico unidos por ligações α -1,4, chamado de homogalacturonana. Algumas porções da cadeia, conhecidas como ramnogalacturonas, podem estar ligadas à açúcares neutros, como a L-ramnose, D-galactose e D-arabinose, o que gera perda da linearidade da cadeia principal, tornando a molécula insolúvel (BHAT, 2000; HIMMEL et al., 2007).

Figura 8 – Estrutura das duas principais frações da pectina, homogalactorona (a) e ramnogalacturona (b).



Fonte: Adaptado de Taiz e Zeiger, 2010.

A cadeia de pectina pode estar esterificada por um grupo metil, tornando a fração solúvel em água, já os ácidos pécticos são constituídos de cadeias de ácido galacturônico livres de metoxilas, os tornando menos solúveis (BHAT, 2000). Por definição, pectinas de alto grau de metoxilação possuem metade dos grupos carboxila na forma de éster metílico (-COOCH₃), e pectinas de baixo grau de metoxilação possuem menos da metade dos grupos carboxila na forma de éster metílico (HIMMEL et al., 2007).

A pectina tem grande importância para indústria de alimentos, sendo empregada como um aditivo de acordo com suas propriedades, como poder geleificante, estabilizante, espessante e até como substituinte de açúcares (KASHYAP et al., 2001).

2.3.2 Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo não ramificado de fórmula geral (C₆H₁₀O₅)_n, altamente resistente. É o principal componente da parede celular vegetal, representando cerca de 30 % da massa seca das paredes primárias, e 50 % a 80 % das secundárias, conferindo rigidez a estrutura vegetal. A celulose é encontrada na forma de microfibrilas lineares, que são compostas por inúmeras subunidades de monômeros de glicose ligados por ligação glicosídica β-1,4 (Figura 9). Podem apresentar massa molecular na ordem de 400.000 u, e até 25.000 moléculas de glicose, formando um conjunto de agregados que são insolúveis em água (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Figura 9 - Moléculas de glicose ligadas entre si por ligação glicosídica do tipo β-1,4.

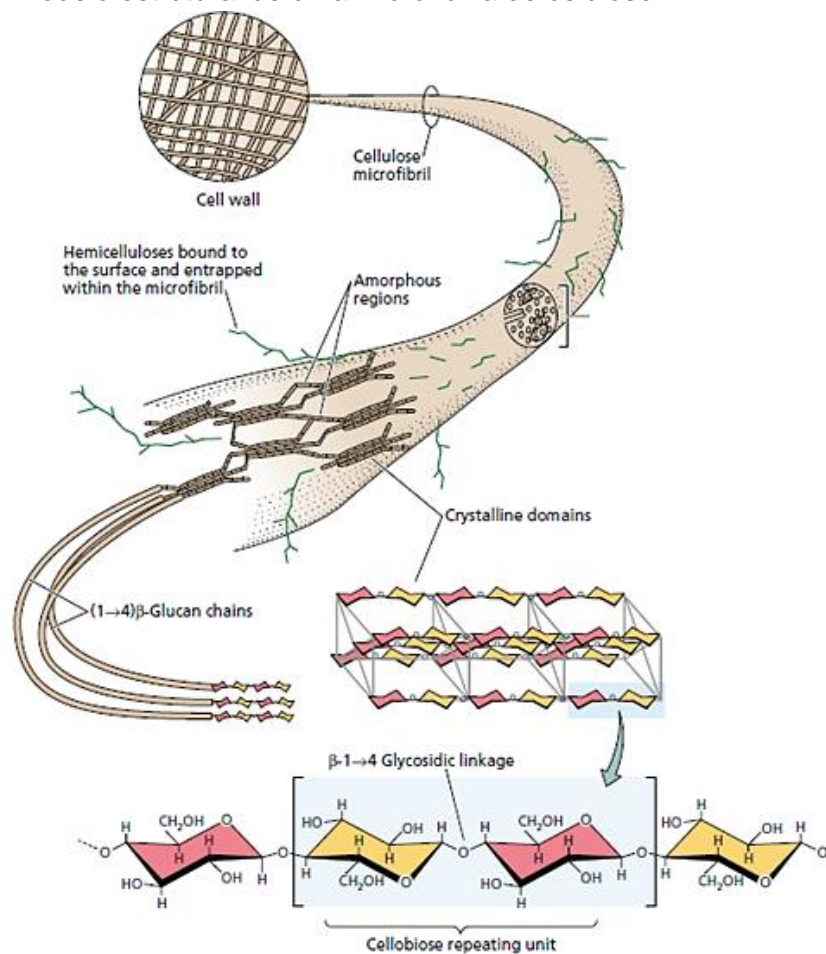


Fonte: Adaptado de Taiz e Zeiger, 2010.

A celulose possui uma extremidade redutora no carbono 1, e outra não redutora no carbono 4. A proximidade entre as moléculas de celulose, e a presença de grupos hidroxilas (OH) na sua estrutura, favorece a formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias, que só são possíveis graças à linearidade das moléculas. As microfibrilas (Figura 10) se unem entre si por ligações de hidrogênio, formando fibras insolúveis, impedindo a solubilidade da celulose em água, dificultando assim a degradação da cadeia (BHAT, 2000).

A celulose apresenta uma estrutura microcristalina com regiões altamente ordenadas (cristalinas) e regiões desordenadas, amorfas (não cristalinas) (LYND et al., 2002). A absorção de moléculas de água só é possível nas zonas amorfas, desordenadas. A cristalinidade da celulose influencia a sua reatividade ao dificultar o acesso de compostos químicos ou enzimas aos grupos funcionais e às ligações químicas nas regiões cristalinas (ZHANG; ZHANG, 2013).

Figura 10 - Modelo estrutural de uma microfibrila de celulose.



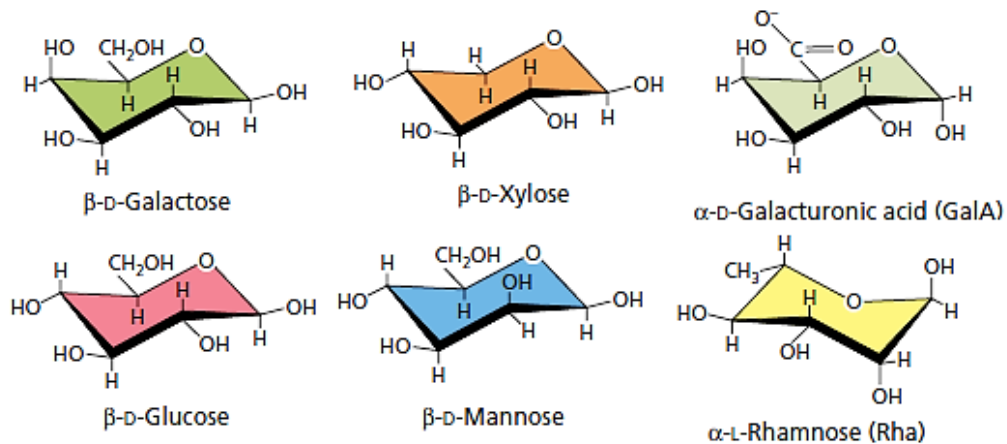
Fonte: Taiz e Zeiger, 2010.

Industrialmente, a celulose é utilizada na produção de tecidos, papel, ração animal, entre outros. Como a celulose é passível de esterificação, na forma esterificada por anidrido acético, formando acetato de celulose, ela é utilizada em fibras têxteis e películas fotográficas e cinematográficas (BHAT, 2000).

2.3.3 Hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos ramificados, que juntamente com a celulose e a pectina constituem a parede celular das células vegetais. Elas podem apresentar estrutura linear ou ramificada, são amorfas e possuem peso molecular relativamente baixo. Podem ser formadas por uma mistura de polímeros de hexoses, pentoses e ácidos urônicos, como β -D-xilose, β -D-manose, β -D-glucose, α -L-arabinose, α -D-galactose e ácido β -D-galactourônico (TAIZ; ZEIGER, 2010). São classificadas de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação lateral. Em todos os casos há uma cadeia do açúcar predominante, podendo estar ramificada, ou não, com diferentes monossacarídeos, sendo os principais representados na Figura 11 (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Figura 11 – Principais açúcares ligados à cadeia da pectina e hemicelulose.



Fonte: Taiz e Zeiger, 2010.

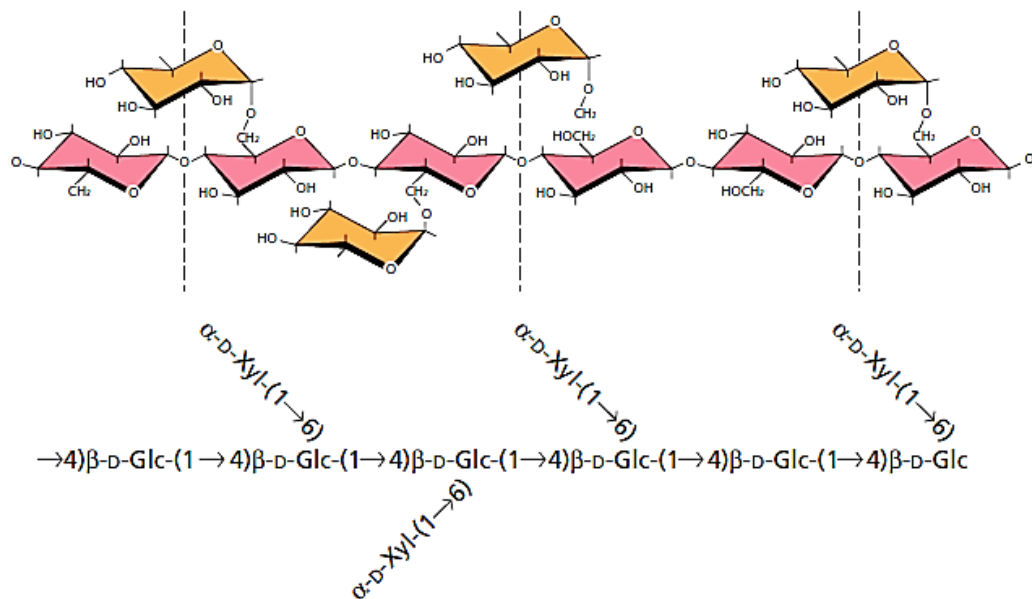
As hemiceluloses são divididas em pentosanas e hexosanas, e estão intimamente associadas às microfibrilas de celulose. Elas contribuem para as propriedades estruturais da parede celular, agindo na regulação do crescimento, elasticidade e desenvolvimento das plantas (LYND et al., 2002). A combinação de

celulose e hemicelulose corresponde a maior porção de carboidratos da planta, (65 - 70 % do peso seco total), sendo estas, as principais responsáveis pela absorção da umidade. Porém, a hemicelulose é mais susceptível à biodegradação do que a celulose, pois é atacada mais facilmente pelas enzimas (TAIZ; ZEIGER, 2010).

2.3.3.1 Xilana

A xilana é o principal tipo de hemicelulose encontrado nas plantas. É um homopolímero formado por uma cadeia linear principal contendo unidades de D-xilose unidas por ligação glicosídica β -1,4, conforme ilustrado na Figura 12. Ela pode apresentar diferentes ramificações em suas cadeias laterais, como ácidos urônicos e seus derivados, resíduos acetil e açúcares como L-arabinose e oligossacarídeos. Além destes açúcares, elas podem apresentar pequenas quantidades de ramnose e ácido galacturônico (EBRINGEROVÁ; HEINZE, 2000).

Figura 12 – Modelo estrutural de uma cadeia de xilana.



Fonte: Taiz e Zeiger, 2010.

As cadeias laterais determinam a solubilidade, conformação física e reatividade da xilana. A solubilidade parcial da xilana em água é devido à presença do grupo acetil na cadeia. As xilanas acetiladas diminuem a atividade das xilanasas, impedindo a degradação completa da xilana pela enzima, provavelmente devido ao

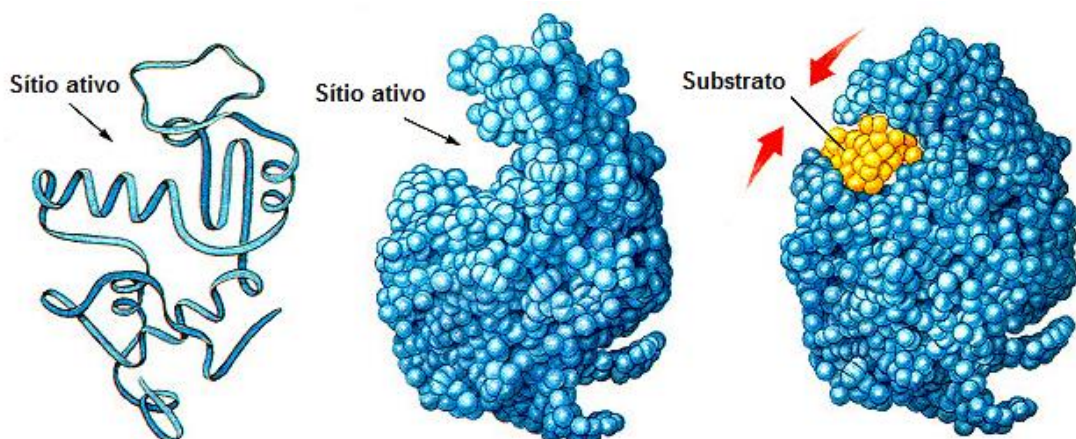
impedimento estérico. Já as xilanas resinosas (arabino-4-O-metilglucuronoxilanas) que correspondem a 10 - 15 % do peso das madeiras, não são acetiladas e possuem cadeias menores e menos ramificadas do que as xilanas acetiladas (BASTAWDE, 1960; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

2.4 ENZIMAS

Enzimas são proteínas, polímeros de cadeia longa com aminoácidos sucessivamente ligados uns aos outros através de ligações peptídicas, que apresentam atividade catalítica (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008). As enzimas aceleram os processos bioquímicos, diminuindo a energia de ativação necessária para que as reações químicas ocorram, sem deslocar o equilíbrio químico da reação por não serem consumidas durante o processo (DIXON; WEBB, 1967).

Cada enzima é específica para uma reação química, sendo ela relacionada a apenas um, ou a vários substratos ao mesmo tempo. A especificidade da enzima é devida à sua forma, a qual apresenta encaixes na superfície, conhecidos como sítios ativos, onde os substratos ou reagentes se ligam (Figura 13). O sítio de ligação entre enzima/substrato é dado por um arranjo tridimensional especial dos aminoácidos de uma determinada região da molécula (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009).

Figura 13 – Modelo da estrutura enzimática e ligação enzima-substrato.



Fonte: Adaptado de Mohammed, 2013.

As enzimas são classificadas com base em alguns critérios: 1) De acordo com a sua origem, são separadas em enzimas de origem animal, origem vegetal e origem microbiana. 2) De acordo com o sistema de classificação estabelecido pela União Internacional de Bioquímica (IUB), elas são divididas em 6 classes com base no tipo de reação que catalisam, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Sistema de classificação das enzimas.

Classe	Função	Enzima
Oxidoredutases	Catalisam a oxirredução, com transferência de elétrons.	Desidrogenases, oxidases, catalases etc.
Transferases	Catalisam a transferência de grupamentos químicos (como metila e hidroxila).	Quinases e transaminases
Hidrolases	Catalisam reações de hidrólise de ligação covalente.	Glicosidases, Peptidases, etc.
Liasas	Catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e CO ₂	Descarboxilases, Aldoases, etc.
Isomerases	Catalise de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos	Epimerases, Isomerases, etc.
Ligases	Catalisam a união de duas moléculas, com gasto de energia (ATP).	Sintetases, carboxilases

A expressão da atividade de uma enzima é medida através de sua velocidade de reação, determinada em condições experimentais pré-estabelecidas. A atividade é expressa em unidades de atividade. A definição proposta pela IUB considera uma unidade de atividade como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de um μmol de substrato por minuto em condições de ensaio definidas (POLAINA; MACCABE, 2007).

As enzimas são consideradas coadjuvantes de tecnologia no processamento de alimentos, e não aditivos alimentares. Na indústria de alimentos, reações catalisadas por enzimas para transformações de alimentos têm sido utilizadas de forma não intencional há muito tempo, sendo essas reações, fundamentais para obtenção de certos produtos (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009). O interesse do uso de enzimas na indústria deve-se a sua especificidade de ação, baixa

toxicidade, e boa atividade em condições brandas de pH, temperatura e pressão (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

2.4.1 Fatores externos que afetam a atividade enzimática

A atividade das enzimas é influenciada por diversos fatores extrínsecos e intrínsecos, como concentração de enzima e substrato, pressão, pH e temperatura do meio reacional. Dependendo das condições do meio, a enzima pode sofrer modificações conformacionais, alterando sua estrutura, dificultando ou impedindo a fixação do substrato ou ainda, modificando a estrutura do sítio ativo, alterando as propriedades catalíticas da enzima (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009).

Mudanças nos fatores externos podem alterar o balanço entre as interações intramoleculares e entre solvente-proteína, podendo levar a desnaturação da enzima (POLAINA; MACCABE, 2007). Assim, para as reações enzimáticas acontecerem é fundamental conhecer as variáveis que podem afetar o processo, sabendo que geralmente elas agem de forma combinada.

- Temperatura:

A temperatura é um dos principais fatores que influenciam a ação das enzimas, sendo que cada enzima apresenta uma temperatura ótima de trabalho. Quanto maior a temperatura, maior é a energia das moléculas, o que aumenta a movimentação e frequência das colisões entre substrato e enzima, levando a uma maior velocidade da reação. Entretanto, aumentar a temperatura além do valor ótimo de atividade enzimática pode gerar resultados negativos (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

Temperaturas altas podem romper ligações não-covalentes que mantêm a estrutura da enzima, levando a desnaturação e perda do poder catalítico da enzima. Já em temperaturas abaixo da ótima, a atividade enzimática pode ser reduzida, porém, as enzimas não são desnaturadas, podendo voltar a atuar com o aumento da temperatura (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010). Entretanto, a relação tempo/temperatura é de extrema importância para avaliar a desnaturação das enzimas pelo calor.

- pH:

A maioria das reações enzimáticas envolve catálise ácido/base, sendo sua atividade diretamente afetada por variações no pH. Assim como a temperatura, cada enzima possui uma faixa ideal de pH para a reação de catálise. A carga do pH pode alterar a conformação geral da proteína, alterando a atividade enzimática (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

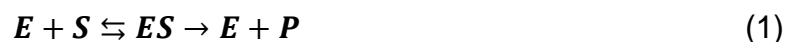
- Concentração do substrato:

A velocidade da reação aumenta com o aumento da concentração de substrato até alcançar o ponto de saturação da enzima. Quando há muito substrato disponível no meio, todas as moléculas de enzimas se encontram com o sítio ativo ocupado, não podendo aumentar a velocidade de reação, sendo que a mesma só tornará a aumentar quando as moléculas das enzimas ficarem livres ou se forem adicionados à solução mais enzimas (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

2.3.2 Cinética enzimática

O estudo cinético de uma enzima procura caracterizar a atividade da enzima e suas propriedades catalíticas. A cinética enzimática estuda o mecanismo pelo qual as enzimas se ligam aos substratos e a velocidade das reações que os transformam em produtos, avaliando a quantidade de produto formado ou a quantidade de substrato consumido por unidade de tempo de reação (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009).

Na ausência de agentes inibidores a taxa de reação é proporcional à quantidade de substrato, e geralmente aumenta com a temperatura (CORNISH-BOWDEN, 2012). A reação enzimática pode ser expressa pela equação (1):



O complexo enzima/substrato (*ES*) tem uma energia de ativação ligeiramente menor que a do substrato isolado (*S*), e a sua formação leva ao aparecimento do estado de transição. A velocidade de uma reação enzimática depende das concentrações de enzima (*E*) e *S*, sendo a formação de produto (*P*) a partir de *ES* a etapa limitante da velocidade da reação (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009).

2.4.3 Modelo cinético de Michaelis-Menten

O modelo cinético proposto por Leonor Michaelis e Maud Menten é um dos mais aceitos, cujo objetivo é explicar a influência das concentrações iniciais de enzima e de substrato na velocidade inicial de reação enzimática (MICHAELIS; MENTEN, 1913). Eles propuseram um modelo de reação enzimática para apenas um substrato, onde primeiro ocorre uma reação reversível, formando um complexo intermediário, enzima/substrato (ES), e a partir deste modelo, eles criaram uma equação (2), que permite demonstrar como a velocidade de uma reação (V) varia com a variação da concentração do substrato (S). Esta equação pode ser expressa graficamente, e representa o efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de reação enzimática.

$$V = \frac{V_{max} \times S}{K_m + S} \quad (2)$$

V_{max} é a maior velocidade na qual a enzima consegue transformar substrato em produto, obtida em meio de saturação de substrato, ou seja, as enzimas atingiram sua atividade máxima, não aumentando mais a velocidade de reação com o aumento da concentração do substrato. A constante de Michaelis (K_m) é uma constante de equilíbrio relativa à dissociação do complexo enzima/substrato. É definida como a medida da afinidade da enzima em relação ao substrato, correspondendo à concentração deste quando a velocidade de reação é igual à metade de seu valor máximo, ou seja, $K_m = \frac{1}{2} V_{max}$ (TRUHLAR, 2015).

2.4.4 Parâmetros termodinâmicos enzimáticos

As enzimas aumentam a velocidade das reações bioquímicas, na ordem de 10^{14} vezes, diminuindo a energia de ativação celular, sem alterar a termodinâmica da reação. A energia de ativação (E_a) é a quantidade mínima de energia necessária para que uma reação química aconteça. Para se superar a energia de ativação de uma reação, passa-se pela formação de um estado intermediário chamado "estado de transição" (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009).

A determinação dos parâmetros termodinâmicos ajuda a entender o mecanismo de desnaturação da enzima, o qual é muito importante em processos enzimáticos, bem como o efeito da temperatura sobre a atividade ou taxa de desnaturação enzimática.

Os parâmetros ΔH (entalpia) e ΔS (entropia) fornecem as energias associadas ao número de ligações não covalentes rompidas e à mudança na desordem enzima/solvente associada com a formação do estado de transição, respectivamente (ORTEGA et al., 2004). As mudanças na estrutura da enzima que geram um aumento da entropia são indicativos de inativação. Valores positivos de entropia sugerem que o desdobramento da enzima pode gerar uma inativação irreversível da enzima; porém, valores baixos sugerem uma desordem insignificante no sistema (ALBERTY, 2005).

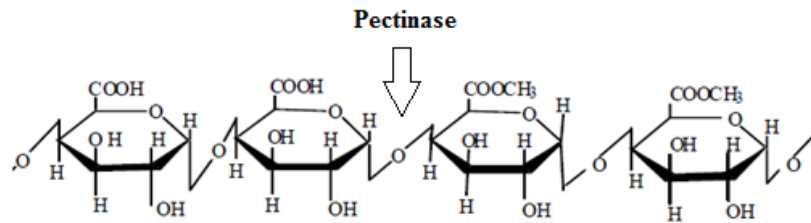
A energia livre de Gibbs (ΔG) de uma enzima é diferente para cada estado: forma nativa e forma desnaturada, e indica quanto da conformação inicial ainda esta preservada ou ativa. A desnaturação ocorre com a diminuição do ΔG , indicando que há menos energia disponível para realização das reações químicas (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

2.4.5 Pectinases

Pectinases (PE), ou enzimas pectinolíticas (EC 3.2.1.15), correspondem a um grupo de enzimas que atuam sobre as substâncias pécticas (Figura 14), e são produzidas por um grande número de bactérias, leveduras, insetos, plantas, e fungos filamentosos, especialmente o *Aspergillus* (BHAT, 2000).

Devido à presença de diversas formas de pectina nas células das plantas, pectinases com diferentes formas de ação são necessárias para sua completa degradação. Embora a pectina apresente outros açúcares em sua composição, as pectinases referem-se ao grupo de enzimas que agem sobre os resíduos de ácido galacturônico (PASHA; ANURADHA; SUBBARAO, 2013).

Figura 14 - Ação da pectinase sob estrutura química da cadeia de pectina.



Fonte: Adaptado de Uenojo e Pastore, 2007.

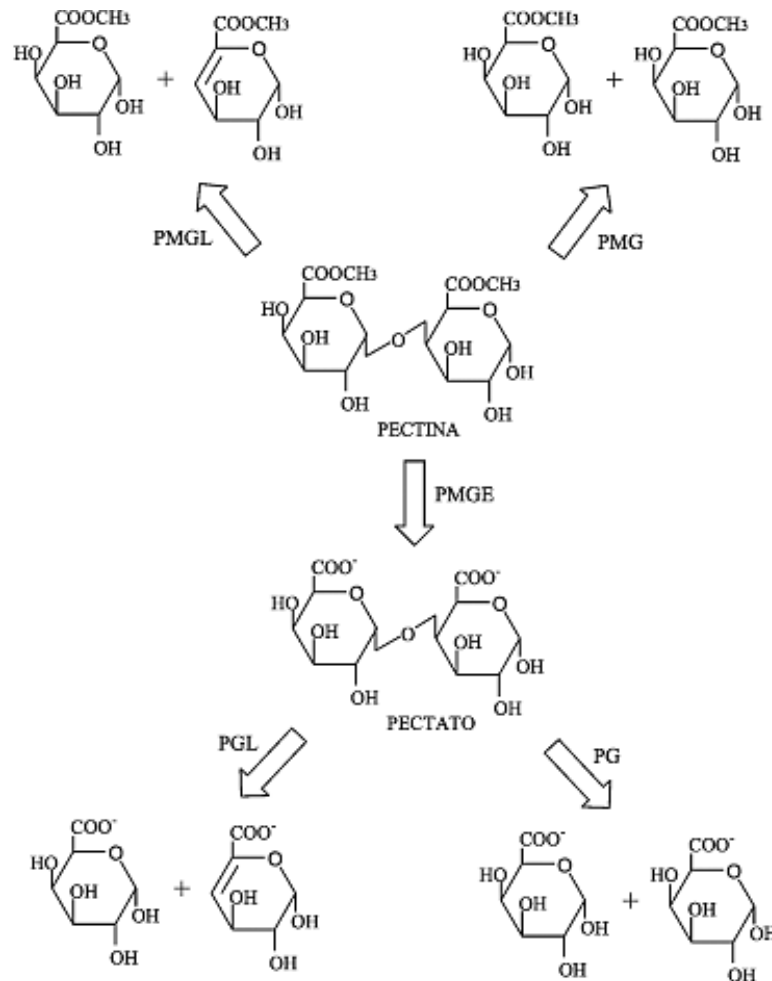
As pectinases são classificadas de acordo com o seu substrato preferencial, mecanismo de ação e sítio de clivagem. As despolimerizantes agem catalisando a reação de hidrólise das ligações α -1,4 da cadeia principal do polissacarídeo péctico, e as desmetoxilantes agem desesterificando a pectina a partir do ácido péctico por remoção dos resíduos de metoxila (ALKORTA et al., 1998). Os mecanismos de ação das diferentes pectinases estão demonstrados na Figura 15.

As enzimas despolimerizantes envolvem as enzimas: hidrolases, polimetilgalacturonases (PMG), que agem sobre a pectina, e a poligalacturonases (PG) que age sobre ácidos pécticos ou ácidos poligalacturônicos com baixo grau de esterificação; e as liases, pectinaliase (PL) que rompe ligações α ,1-4 entre resíduos de ácido galacturônico com alta metilação pelo mecanismo de trans-eliminação, polimetilgalacturnatoliase (PMGL) e pectatoliase poligalacturonatoliase (PGL) (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

As PG catalisam a hidrólise de ligações α ,1-4 entre resíduos de ácido galacturônico não esterificado. Sua ação pode ser internamente à cadeia principal (endo-PG), liberando oligômeros, ou na extremidade não-redutora, liberando monômeros (exo-PG) (ALKORTA et al., 1998).

A pectinaesterase (polimetilgalacturonatoesterase, PMGE), possui atividade desesterificante ou desmetoxilante, removendo os grupos metil éster da pectina, liberando metanol e convertendo pectina em pectato (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). Esta enzima é imprescindível para a ação de outras enzimas, como as poligalacturonases, uma vez que estas atuam sobre pectina de baixa metoxilação (ALKORTA et al., 1998; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Figura 15 – Ação das pectinases em uma molécula de pectina.



Legenda: PMGL: Pectinaliase; PMG: polimetilgalacturonase; PGL: Pectatoliase
PMGE: pectinaesterase; e PG: poligalacturonase.

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

Em determinados produtos agroindustriais, como as geleias, a presença da pectina é vantajosa, pois ela é responsável pela consistência do produto. Contudo, no caso da elaboração do suco de uva ou vinho, a pectina dificulta a extração do mosto, interferindo em seu rendimento (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). Devido à variedade de estruturas pécticas encontradas no meio, as diferentes enzimas que compõem o complexo pectinolítico são utilizadas para hidrolisar a pectina da uva (RIBEIRO et al., 2010; UGLIANO, 2009).

2.4.6 Celulases

As celulases (CE) são biocatalisadores altamente específicos, responsáveis pela decomposição de polissacarídeos estruturais, compostos fibrosos insolúveis, como celulose e hemiceluloses (BELITZ, GROSCH; SCHIEBERLE, 2009).

Pesquisas sobre celulases (EC 3.2.1.4) começaram no início dos anos 50, devido ao seu enorme potencial para converter celulose, a fonte mais abundante e renovável de energia na Terra, em glicose e açúcares solúveis. As celulases são utilizadas em diversas aplicações biotecnológicas como, na indústria têxtil, nutrição animal, e também na indústria de bebidas (REESE; MANDELS, 1984). Entretanto, o interesse por essas enzimas tem aumentado muito devido a sua utilização no processo de produção de etanol a partir de resíduos de materiais lignocelulósicos como vegetais, grãos e madeira (BHAT, 2000).

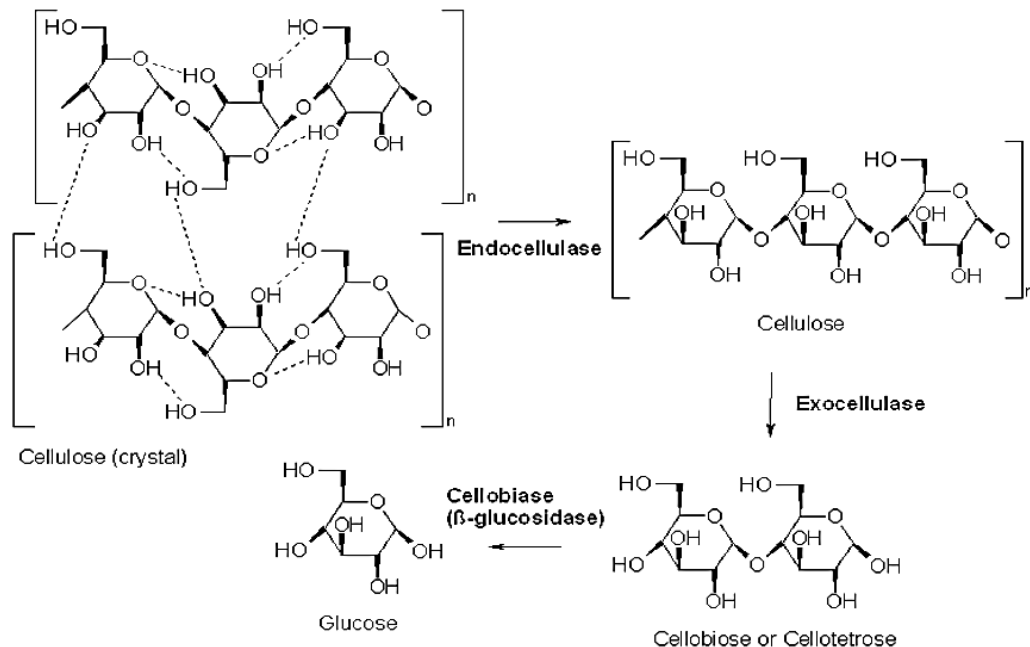
Na indústria de bebidas, as celulases facilitam a extração e maceração de sucos de fruta por romperem a rede de celulose que ajuda a reter o líquido nas células vegetais. Na produção de vinhos, as beta-glicosidases, melhoram a extração de pigmentos e substâncias aromatizantes presentes na casca da uva. Além disso, as celulases degradam compostos de sabores desagradáveis, liberando substâncias flavorizantes, melhorando o aroma e o sabor do vinho (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

As celulases são classificadas de acordo com a posição de ataque no substrato, dividindo-se em três grandes grupos, como demonstrado na Figura 16 (WRIGHT; WYMAN; GROHMANN, 1988). Quando atuam em conjunto, as enzimas do complexo celulolítico apresentam um rendimento melhor do que na forma individual (BHAT, 2000).

- **Endoglucanases:** catalisam a hidrólise interna de ligações β -1,4-D-glicosídicas da celulose, formando oligossacarídeos. Atuam somente na porção amorfa da celulose.
- **Exoglucanases:** agem nas extremidades cadeia e liberam unidades de glicose ou celobiose.

- **β -glicosidases**: hidrolisam a ligação entre duas unidades de glicose que formam a celobiose, liberando unidades de glicose.

Figura 16 – Ação das principais celulases sob a cadeia de celulose.



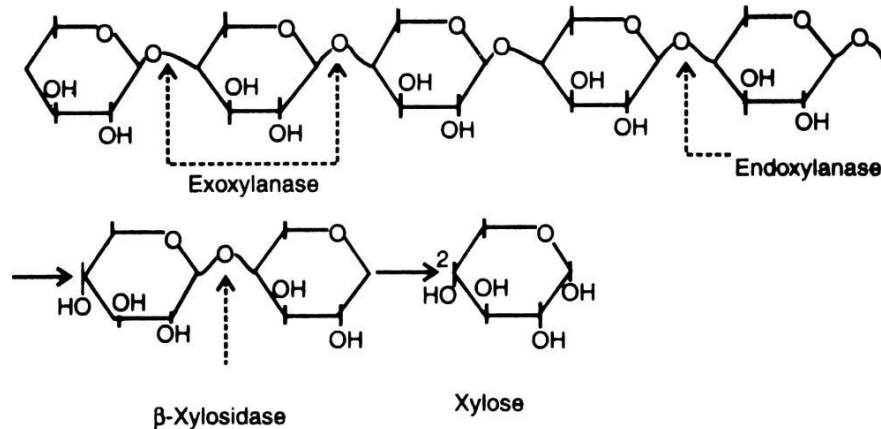
Fonte: Tanthapanichakoon e Jian, 2012.

As β -glicosidases têm sido utilizadas na indústria de vinhos devido à sua capacidade de liberar compostos aromáticos, como terpenos e compostos fenólicos com capacidade antioxidante, modificando os precursores glicosilados presentes, no entanto é inibida por altas concentrações de glicose (TODARO et al., 2008).

2.4.7 Xilanases

As xilanases (XLN) são hemicelulases que catalisam as ligações β ,1,4-D-xilosídicas da xilana, conforme representado na Figura 17. Elas promovem a desestrutura do entrelaçamento entre hemicelulose e celulose da parede celular vegetal, contribuindo para o aumento da eficiência das celulases na hidrólise das microfibrilas (BASTAWDE, 1960). O interesse industrial pelas hemicelulases vem crescendo bastante nas últimas décadas, principalmente nas indústrias de papel e celulose, alimentos e têxtil (BEG et al., 2001). Essas enzimas são produzidas por diversos organismos incluindo bactéria, algas, fungos, protozoários, entre outros (HECK; HERTZ; AYUB, 2002).

Figura 17 – Hidrólise enzimática da cadeia de xilana pelo complexo das xilanases.



Fonte: Biocyclopedia, 2012.

Devido à diversidade e complexidade da estrutura da hemicelulose, uma diversidade de enzimas é requerida para sua total degradação (BEG et al., 2001). As β -1,4-endoxilanases, β -xilanases, (EC 3.2.1.8) formam o principal grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da xilana, pois clivam as ligações glicosídicas internas da cadeia principal, liberando xilo-oligossacarídeos, resultando em uma diminuição do grau de polimerização do substrato. As β -D-xilosidases, β -xilosidases são exoglicosidases que hidrolisam pequenos oligômeros xilooligossacarídeos e xilobiose (BASTAWDE, 1960).

A ação sinérgica entre β -xilanases e β -xilosidases com enzimas de desramificação como α -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), acetil xilana esterase (EC 3.1.1.6) e α -glucuronidase (EC 3.2.1) é essencial para a hidrólise completa da xilana em xilose (BASTAWDE, 1960; BEG et al., 2001).

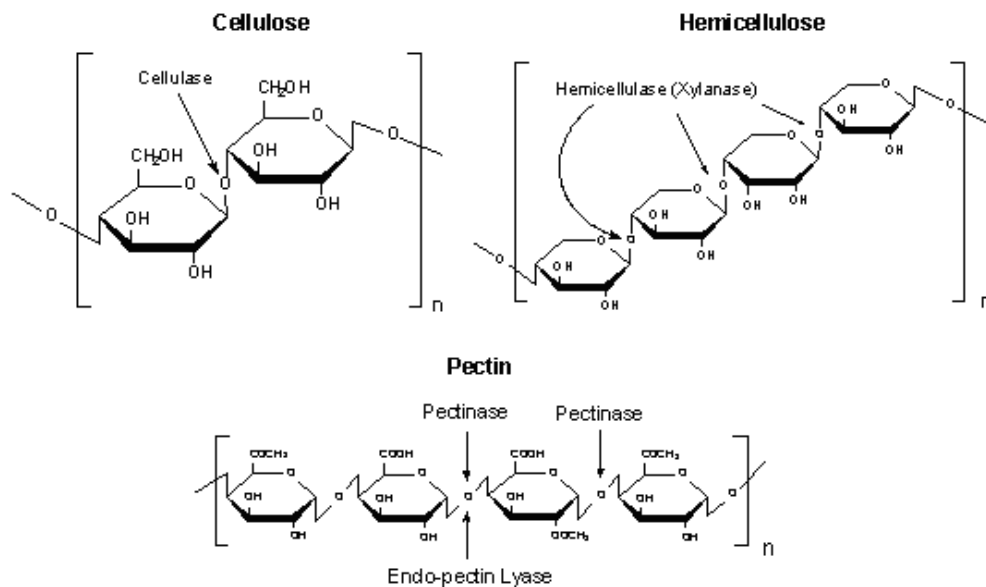
2.4.8 Aplicação de enzimas para extração de compostos da uva

O mercado global de enzimas industriais é crescente, e as xilanases juntamente com as celulases e pectinases representam 20 % desse mercado (MARKETS; MARKETS, 2017). As indústrias de bebidas, principalmente a de suco e de vinho, representam uma parte significativa do mercado de enzimas, devido ao aumento do consumo e melhorias no processo (DAL MAGRO et al., 2016).

Durante a produção do vinho algumas reações enzimáticas podem ser provenientes de enzimas originárias da própria uva, produzidas por fungos que colonizam a superfície da baga, ou por leveduras e bactérias que crescem no mosto (MEYER; ARNOUS, 2010). No entanto, essas enzimas normalmente são inibidas pelas condições adversas de vinificação, como elevadas concentrações de açúcares, etanol, polifenóis, e baixo pH, resultando em reações incompletas (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

A tecnologia enzimática oferece muitos benefícios para a indústria da uva e do vinho (RIBEIRO et al., 2010). Na vinificação, alguns preparados enzimáticos de celulase em combinação com pectinase e hemicelulase, são utilizados para aumentar a degradação das paredes celulares da casca (GIL; VALLÉS, 2001). Seus métodos de ação nos polissacarídeos estruturais presentes na uva estão representados na Figura 18.

Figura 18 – Modelo de ação das enzimas celulases, hemicelulases e pectinases sob seus substratos.



Fonte: "Lysing Enzymes", [s.d.]

Estas enzimas exógenas são utilizadas antes da prensagem da matéria-prima, diminuindo o tempo de processamento e melhorando a extração de compostos. Porém, elas também podem ser adicionadas em outras fases do processo de vinificação, como na clarificação, onde auxiliam a reduzir a viscosidade e turbidez, facilitando a filtração. A turbidez e viscosidade dos sucos são

ocasionadas principalmente pela presença de polissacarídeos como a pectina e a hemicelulose (BHAT, 2000; GIL; VALLÉS, 2001).

Muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos abrangendo as mais diversas áreas de atuação das enzimas na indústria da uva. A maioria concorda que a aplicação de enzimas exógenas, aumenta a concentração de compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante do mosto de uva (TOALDO et al., 2015).

Segade et al. (2015) fizeram um estudo sobre a aplicação de enzimas na uva Cabernet Sauvignon para extração de antocianinas da casca. A ação das enzimas aumentou 15 % a extração das antocianinas e sua estabilidade, ocorrendo uma maior extração de malvidina glicosídica (9 %), e menor de delphinidina (5 %). Já no trabalho de Lima et al. (2015) houve uma maior concentração de procianidinas B1 e B2, menor turbidez e menor concentração de catequinas e de ácido acético com a aplicação de pectinases durante a maceração do suco de uva.

Bautista-Ortín et al. (2005) utilizaram diferentes enzimas de maceração (xilânase, celulase, poligalacturonase e pectinaesterase) em sementes de uvas Monastrell e Cabernet Sauvignon para extração de proantocianidinas, que são compostos fenólicos relacionados à adstringência. O estudo mostrou que a enzima celulase obteve melhor desempenho em relação à degradação da parede celular, promovendo maior extração das proantocianidinas das sementes. Essas enzimas normalmente são utilizadas para extração de compostos da casca, mas mostraram papel importante na extração de compostos das sementes, os quais contribuem para a estrutura e adstringência do vinho.

Gruz et al. (2013) realizaram a extração enzimática para recuperação de compostos bioativos do bagaço de uva tendo em vista a aplicação em alimentos. Com a aplicação de pectinases e hemicelulases durante o processamento, a atividade antioxidante aumentou 83 % na temperatura de 50 °C e pH 4,0.

Além da aplicação de pectinases e celulases, outros grupos de enzimas vêm sendo estudados para aplicação na uva. Chaves (2014) avaliou o efeito da β -liase na liberação de tióis voláteis, mercaptanos, em vinhos brancos de castas

portuguesas. Os tióis são compostos voláteis de enxofre e conferem aos vinhos aromas tropicais. A β -liase é produzida pelas leveduras durante a fermentação alcoólica, porém com sua adição exógena (Endozym Thiol®) verificou-se um aumento na concentração de tióis e melhor qualidade aromática. Botelho, Valiau e Silva (2011) utilizaram β -ciclodextrinas para remover compostos de aromas em vinho tinto. Quando presente no vinho, a levedura *Brettanomyces* spp. leva a formação de 4-etilfenol e 4-etilguaiacol, aromas indesejáveis derivados dos ácidos p-coumárico e ferúlico, que estão presente na uva (SUÁREZ et al., 2007). Eles concluíram que uma concentração de $11,52 \text{ g.L}^{-1}$ de β -ciclodextrinas é suficiente para reduzir a percepção dos odores desagradáveis, e que os vinhos apresentaram um aumento significativo na intensidade corante e no índice de polifenóis totais.

2.5 ULTRASSOM

O ultrassom é uma onda mecânica acústica produzida pelo movimento oscilatório das partículas de um meio. Por ser uma forma de energia mecânica tem como principais propriedades, reflexão, adsorção e dispersão, e precisa de um meio físico para se propagar, como através de sólidos, líquidos ou gases (MASON et al., 2005). Ele emite frequências acima de 20 kHz, tendo em vista que o ser humano só consegue detectar frequências entre 20 Hz a 20 kHz. Frequências abaixo de 20 Hz são referidas como infrassom (KENTISH; ASHOKKUMAR, 2011).

As ondas ultrassônicas são classificadas em dois grandes grupos, dependendo da sua frequência e intensidade. Ultrassons de baixa energia são de alta frequência (2-20 MHz) e baixa intensidade ($<1 \text{ W.cm}^{-2}$) e não são destrutivos, tendo emprego em técnicas de maturação, concentração ou dispersão de partículas em fluidos (O'DONNELL et al., 2010). Ondas ultrassônicas de alta energia são de baixas frequências (20-100 kHz) e desenvolvem níveis de potência mais altos (10 - 1000 W.cm^{-2}), com energia suficiente para romper enlaces intermoleculares, sendo capazes de modificar algumas propriedades físicas e favorecer reações químicas (MASON et al., 2005).

O ultrassom é produzido a partir de um transdutor, que converte a energia elétrica em energia mecânica sonora em frequências ultrassônicas. Os sistemas de aplicação de ultrassom mais utilizados são os banhos e as sondas. No banho, o transdutor é diretamente unido à base ou às paredes do tanque e a energia ultrassônica é transmitida diretamente através de um líquido, ocorrendo muita dispersão de energia ultrassônica (SINISTERRA, 1992).

A utilização do ultrassom em tecnologia de alimentos tem evoluído muito com o passar dos anos, pois é uma técnica que tem apresentado efeitos benéficos no processamento, na preservação, maiores rendimentos e seletividade, tempos de processamento mais curtos, redução dos custos de operação e manutenção, melhoria dos atributos de qualidade, e redução de patógenos (PATIST; BATES, 2008). Além de melhorar a qualidade e segurança dos alimentos, o ultrassom possibilita a elaboração de novos produtos com propriedades distintas (AWAD et al., 2012). Uma das maiores vantagens do uso do ultrassom na indústria de alimentos comparado com outras técnicas é sua ação eficiente, sendo considerada uma técnica segura e não poluente (KENTISH; ASHOKKUMAR, 2011), devido ao fato de se tratar de uma nova tecnologia, com sustentabilidade ambiental (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011).

As técnicas clássicas de extração de materiais a partir de fontes vegetais baseiam-se na escolha do método, juntamente com a utilização de calor e/ou agitação, e a extração dos compostos orgânicos contidos no interior das células da planta é significativamente melhorada pelo uso de ultrassom (MASON; PANIWNYK; LORIMER, 1996).

2.5.1 Efeitos do ultrassom

O ultrassom possui efeitos físicos e químicos que são dependentes da frequência e intensidade de aplicação, sendo sua maioria decorrente do fenômeno da cavitação (MASON et al., 2005). Em frequências baixas (20 - 100 kHz), há a predominância de efeitos físicos de cavitação, com o colapso de microbolhas em todo o líquido. Em frequências intermediárias (200 - 500 kHz), os efeitos químicos são mais dominantes, e os efeitos físicos da cavitação são menos frequentes, porém

ainda estão presentes. Em frequências altas (> 1 MHz), a cavitação e os efeitos químicos são menos prováveis, e os efeitos de transmissão acústica são mais ocorrentes (KENTISH; ASHOKKUMAR, 2011).

Os efeitos físicos do ultrassom, cavitação, podem ser resumidos no aumento da turbulência do sistema através da formação de bolhas que diminuem de tamanho, seguido da expansão e implosão, levando ao colapso das bolhas, mudanças químicas, e aumento de pressão e temperatura (ASHOKKUMAR; MASON, 2007). O aumento da pressão gerado pelo colapso das bolhas durante a cavitação resulta na propagação das ondas de choque, causando severas turbulências nas imediações, levando a quebra da cadeia de polímeros, ou a quebra da parede celular das plantas (LIN; THOMAS, 2004). Já energia gerada com o colapso das bolhas é convertida em calor, levando a um aumento da temperatura do meio (KENTISH; ASHOKKUMAR, 2011).

Decorrente das altas temperaturas, alguns radicais podem ser formados, ou produzidos, por reações entre os radicais primários (OH, H) e outras moléculas, como nitrogênio (N₂), formando ácido nítrico. A formação do radical OH pode afetar a qualidade de alguns alimentos, reduzindo sua capacidade antioxidante, isso é decorrente dos efeitos químicos do ultrassom no meio (ASHOKKUMAR et al., 2008). Os efeitos mecânicos proporcionam uma maior penetração do solvente nas células, melhorando a transferência de massa, e favorecendo algumas reações enzimáticas. O ultrassom age acelerando o transporte dos substratos e enzimas durante as reações, melhorando a eficiência da reação enzimática (FENG et al., 2011).

2.5.2 Uso de ultrassom e enzimas para processos de extração

O processo de extração de suco de frutas utilizando tratamento enzimático apresenta uma melhor extração de compostos, porém o tempo de extração é mais longo, o que pode elevar o custo de processamento (TCHABO et al., 2015). Como alternativa, novas técnicas de extração como, extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas e extração assistida por ultrassom e hidrólise enzimática têm sido desenvolvidos com o objetivo de reduzir o tempo de maceração, aumentar o rendimento, e melhorar a qualidade (WANG; WELLER, 2006).

O ultrassom pode ser utilizado em combinação com o tratamento enzimático para reduzir o tempo de maceração, e aumentar o rendimento (LIEU; LE, 2010), pois ele atua na ruptura das paredes celulares, facilitando a liberação do conteúdo intracelular (MASON; PANIWNYK; LORIMER, 1996). Uma das primeiras funções do uso de ultrassom na bioquímica era induzir a quebra das paredes celulares, sendo assim, a mesma potência de ultrassom pode ser utilizada para produzir um efeito positivo sobre a atividade enzimática (DELGADO-POVEDANO; LUQUE DE CASTRO, 2015).

Yachmenev et al. (2009) sugeriram que o uso combinado de enzima/ultrassom na extração resulta em: (a) efeitos de cavitação melhorando o transporte da enzima para a superfície do substrato, aumentando a velocidade da reação; (b) abertura da superfície do substrato, favorecendo a ação das enzimas, como resultado do impacto mecânico de cavitação. Existem estudos que avaliam o uso de ultrassom combinado com pré-tratamento enzimático na extração, visando reduzir o tamanho das partículas (SZABO et al., 2015), e o uso do ultrassom em reações enzimáticas, onde a energia de cavitação acelera a velocidade da reação (TIAN et al., 2004). Embora tenha sido demonstrado que o ultrassom pode acelerar as reações enzimáticas, alguns estudos apontam que ocorre a inativação das enzimas (ÖZBEK; ÜLGEN, 2000).

2.5.2.1 *Efeitos do ultrassom na enzima*

A utilização do ultrassom em reações de hidrólise pode ser uma ferramenta importante no controle sobre agregação ou dispersão de partículas, proporcionando mudanças conformacionais na estrutura das proteínas, assim como aumentando a transferência de massa entre substrato-enzima (YU; ZENG; LU, 2013).

Tendo em vista, o colapso cavitacional ocasionado pelas ondas ultrassônicas, o qual proporciona aumento da pressão e temperatura em regiões determinadas, muitos estudos começaram a ser desenvolvidos, sugerindo que os efeitos mecânicos e químicos gerados durante a sonicação desempenham um papel importante na inativação de enzimas (ISLAM; ZHANG; ADHIKARI, 2014; ENTEZARI; PÉTRIER, 2005; O'DONNELL et al., 2010).

Em reações enzimáticas o ultrassom pode agir alterando as condições do meio, e perturbando as ligações fracas, induzindo mudanças conformacionais na estrutura das proteínas. Isso pode levar a inativação de muitas enzimas, devido às pequenas alterações na estrutura e nas condições ambientais, como temperatura, pressão, tensão de cisalhamento e pH (ISLAM; ZHANG; ADHIKARI, 2014). Os efeitos cavitacionais em combinação com a frequência de irradiação podem promover a formação de radicais livres, que atuam alterando as células e enzimas presentes no meio. No caso de proteínas globulares, como no caso das enzimas, frequências entre 0-100 kHz são fortemente absorvidas e podem levar ao rompimento da estrutura. Com a formação de radicais hidroxila (OH) e a geração de calor durante o colapso de bolhas, pode-se afetar a estabilidade do biocatalisador, sendo este um fator limitante para aplicações combinadas de ultrassom/enzimas (MAWSON et al., 2011).

O fator limitante para o uso do ultrassom em reações bioquímicas é o aumento na temperatura promovido pela irradiação, uma vez que enzimas podem ser inativadas termicamente. Contudo, este não é de todo um fator negativo já que a inativação térmica de enzimas é importante em alguns processos biotecnológicos. É preciso destacar que a inativação não ocorre em todos os casos, pois o efeito do ultrassom pode ser destrutivo ou construtivo dependendo da intensidade das ondas (MASON et al., 2011).

Entretanto, o tratamento com ultrassom em frequência e intensidade adequada pode levar a um aumento da atividade enzimática, sendo utilizado como forma de ativar a enzima. Em baixas frequências, o ultrassom favorece algumas reações enzimáticas, tanto com a melhora na transferência de massa, quanto atuando sobre a estrutura da enzima (MASON et al., 2011), porém, os efeitos do ultrassom na ativação das enzimas ainda não estão bem claros.

2.6 REFERÊNCIAS CAPÍTULO I

ALBERTY, R. A. Frontmatter. In: **Thermodynamics of Biochemical Reactions**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2003. p. 547.

ALKORTA, I. et al. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 21–28, 1998.

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications**. Boca Raton, USA: CRC Press, 2006. v. 45

ASHOKKUMAR, M. et al. Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: a preliminary study on a model system. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 155–160, 2008.

ASHOKKUMAR, M.; MASON, T. J. Sonochemistry. In: JOHN WILEY & SONS INC (Ed.). **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2007.

AWAD, T. S. et al. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 410–427, 2012.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.

BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 353–368, 1990.

BAUTISTA-ORTÍN, A. B. et al. Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. **International journal of food science & technology**, v. 40, n. 8, p. 867–878, 2005.

BEG, Q. K. et al. Microbial xylanases and their industrial applications: A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3–4, p. 326–338, 2001.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. Food chemistry, 4th revised and extended edn. **Heidelberg, Germany**, p. 62–63, 2009.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355–383, 2000.

BIOCYCLOPEDIA. **Biomass Conversion**. Disponível em:
<http://www.eplantscience.com/index/biotechnology/biotechnology_and_environment/biomass_a_renewable_source_of_energy/biotech_biomass_conversion.php>.
Acesso em: 7 fev. 2017.

BOTELHO, G.; VALIAU, C.; SILVA, A. M. Effect of cyclodextrins on off-odours removal of red wine: An innovative approach. **Ciencia e Tecnica Vitivinicola**, v. 26,

n. 2, p. 63–68, 2011.

CAMARGO, U. A. Suco de uva: matéria-prima para produtos de qualidade e competitividade. In: GUERRA, C. C.; SEBEN, S. S. (Eds.). . **X Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia**. Bento Gonçalves: EMBRAPA, 2005. p. 371.

CASTAÑEDA-OVANDO, A. et al. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 859–871, 2009.

CHAVES, A. M. **Efeito Da Enzima β -Liase Endozym Thiol® Na Libertação De Tióis Voláteis Em Vinhos De Castas Portuguesas**. Lisboa: Instituto Superior De Agronomia. p. 1 - 49, 2014.

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813–835, 2011.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: Editora EPUB, 2008.

CORNISH-BOWDEN, A. **Fundamentals of Enzyme Kinetics**. 4th. ed. London: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2012.

DAL MAGRO, L. et al. 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**, v. 9, n. 2, p. 365–377, 2016.

DAVAUX, F.; OUBART, C.; Thermo-detente: uma nova abordagem à termovinificação. **Revista internet de viticultura e enologia**, Nº 7, 2009.

DELGADO-POVEDANO, M. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D. A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship. **Analytica chimica acta**, v. 889, p. 1–21, 2015.

DIXON, M.; WEBB, E. C. **Enzymes**. London: Longmans, Green & Co, 1967.

EBRINGEROVÁ, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives - Biopolymers with valuable properties, 1: Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 21, n. 9, p. 542–556, 2000.

ENTEZARI, M. H.; PÉTRIER, C. A combination of ultrasound and oxidative enzyme: Sono-enzyme degradation of phenols in a mixture. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 12, n. 4, p. 283–288, 2005.

FACHIN, D. et al. Inactivation kinetics of polygalacturonase in tomato juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 4, n. 2, p. 135–142, 2003.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos**. 4. ed.

Artmed, 2010.

FLANZY, C. **Enología: fundamentos científicos y tecnológicos**. 2 ed. Madrid: Mundi-Prensa, 2003.

FRANCIS, F. J. FEATURES-Anthocyanins and Betalains: Composition and Applications. **Cereal Foods World**, v. 45, n. 5, p. 208–213, 2000.

FUGELSANG, K. C.; EDWARDS, C. G. **Wine microbiology: practical applications and procedures**. Springer Science & Business Media, 2006.

GIL, J. V; VALLÉS, S. Effect of macerating enzymes on red wine aroma at laboratory scale: exogenous addition or expression by transgenic wine yeasts. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5515–5523, 2001.

GIOVANINNI, E.; MANFROI, V. **Viticultura e Enologia: elaboração de grandes vinhos nos terroirs brasileiros**. Bento Gonçalves: IFRS, 2009.

GRUZ, A. P. G. et al. Recuperação De Compostos Bioativos a Partir Do Bagaço De Uva 1. **Rev. Bras. Frutic**, v. 35, n. 4, p. 1147–1157, 2013.

GUERRA, C. Influência de parâmetros enológicos da maceração na vinificação em tinto sobre a evolução da cor e a qualidade do vinho. **X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia**. EMBRAPA. Bento Gonçalves, 2003.

HECK, J. X.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Cellulase and xylanase production by isolated amazon Bacillus strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 213–218, 2002.

HIMMEL, M. E. E. et al. Cellulases , Hemicellulases , and Pectinases. n. 303, 2007.

ISLAM, M. N.; ZHANG, M.; ADHIKARI, B. The Inactivation of Enzymes by Ultrasound—A Review of Potential Mechanisms. **Food Reviews International**, v. 30, n. 1, p. 1–21, 2014.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931–2944, 2005.

KANNER, J.; FRANKEL, E.; GRANIT, R. Natural antioxidants in grapes and wines. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, p. 64–69, 1994.

KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource technology**, v. 77, n. 3, p. 215–227, 2001.

KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. The physical and chemical effects of ultrasound. In: **Ultrasound technologies for food and bioprocessing**. New York. Springer, 2011. p. 1–12.

KONG, J. M. et al. Analysis and biological activities of anthocyanins.

Phytochemistry, v. 64, n. 5, p. 923–933, 2003.

LEE, H.; FENG, H. Effect of Power Ultrasound on Food Quality. In: **Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing, Food Engineering Series**. Springer, 2011. p. 559–582.

LIANG, Z. et al. Anthocyanin composition and content in grape berry skin in Vitis germplasm. **Food chemistry**, v. 111, n. 4, p. 837–844, 2008.

LIEU, L. N.; LE, V. V. M. Application of ultrasound in grape mash treatment in juice processing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, n. 1, p. 273–279, 2010.

LIMA, M. DOS S. et al. Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced in industrial scale by different processes of maceration. **Food Chemistry**, v. 188, n. 0, p. 384–392, 2015.

LIN, H.-Y.; THOMAS, J. L. Factors affecting responsivity of unilamellar liposomes to 20 kHz ultrasound. **Langmuir**, v. 20, n. 15, p. 6100–6106, 2004.

LYND, L. R. et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.

Lysing Enzymes. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/lysing-enzymes.html>>. Acesso em: 4 fev. 2017.

MARKETS and MARKETS. Disponível em: <http://www.marketsandmarkets.com/>

MASON, T. J. et al. Application of ultrasound. **Emerging technologies for food processing**, v. 32, p. 3–351, 2005.

MASON, T. J. et al. New evidence for the inverse dependence of mechanical and chemical effects on the frequency of ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 1, p. 226–230, 2011.

MASON, T. J.; PANIWNYK, L.; LORIMER, J. P. The uses of ultrasound in food technology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 3, n. 3, p. S253–S260, 1996.

MAWSON, R. et al. Ultrasound in enzyme activation and inactivation. In: **Ultrasound technologies for food and bioprocessing**. [s.l.] Springer, 2011. p. 369–404.

MEYER, A. S.; ARNOUS, A. Enzymatic modifications of grape skin phenolics. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v. 21, n. 1, p. 26–29, 2010.

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. M. L. The kinetics of invertin action. **FEBS Letters**, v. 587, n. 17, p. 2712–2720, 2 set. 1913.

MOHAMMED, S. **Enzymes**. Disponível em: <<https://sabeerahmohammed.wordpress.com/2013/04/11/enzymes/>>. Acesso em: 04 fev. 2017

- MOHOLKAR, V. S.; NIERSTRASZ, V. A.; WARMOESKERKEN, M. Intensification of mass transfer in wet textile processes by power ultrasound. **Autex Research Journal**, v. 3, n. 3, p. 129–138, 2003.
- MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C. **Wine Chemistry and Biochemistry**. New York, NY: Springer New York, 2009.
- MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas - Poderosa Ferramenta na Indústria. **Ciência Hoje**, v. 41, n. January, p. 28–33, 2007.
- O'DONNELL, C. P. et al. Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 7, p. 358–367, 2010.
- ORTEGA, N. et al. Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. **Food Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 209–217, 2004.
- ÖZBEK, B.; ÜLGEN, K. O. Ö. The stability of enzymes after sonication. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 9, p. 1037–1043, 2000.
- PASHA, K. M.; ANURADHA, P.; SUBBARAO, D. Applications of pectinases in industrial sector. **International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology**, v. 16, n. 1, p. 89, 2013.
- PATIST, A.; BATES, D. Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 147–154, 2008.
- PUÉRTOLAS, E. et al. Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle. **Food chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1063–1070, 2010.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, Guanabara, 2007.
- REESE, E. T.; MANDELS, M. Rolling with the times: production and applications of *Trichoderma reesei* cellulase. **Annu. Rep. Ferment. Processes;(United States)**, v. 7, 1984.
- RIBEIRO, D. S. et al. Enzymes in juice processing: a review. **International journal of food science & technology**, v. 45, n. 4, p. 635–641, 2010.
- RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; LONVAUD, A. **Handbook of Enology, The microbiology of wine and vinifications**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2006. v. 1
- RITSCHHEL, P.; QUECINI, V. Na Mesa Dos Brasileiros. In: REIFSCHNEIDER, F. J.; NASS, L. L.; HENZ, G. P. (Eds.). . **Uma pitada de biodiversidade na mesa dos brasileiros**. 1 ed ed. Brasília: 2014
- RIZZON, L. A.; DALL'AGNOL, I. **Vinho tinto**. Brasília: Embrapa Informação

Tecnológica; Brasília: Embrapa, 2007.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. **Suco de uva**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Cabernet Sauvignon para elaboração de vinho tinto. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 22, n. 2, p. 192–198, 2002.

SEGADE, S. R. et al. Impact of maceration enzymes on skin softening and relationship with anthocyanin extraction in wine grapes with different anthocyanin profiles. **Food Research International**, v. 71, p. 50–57, 2015.

SINGLETON, V. L.; ESAU, P. Phenolic substances in grapes and wine, and their significance. **Advances in food research. Supplement**, v. 1, p. 1–261, 1968.

SINISTERRA, J. V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview. **Ultrasonics**, v. 30, n. 3, p. 180–185, 1992.

SOTERO, V. et al. Compuestos fenólicos en pulpa y semillas de cuatro frutales amazónicos de la familia Sterculiaceae. **Rev Soc Quím Perú**, v. 77, n. 1, p. 66–74, 2011.

SUÁREZ, R. et al. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 10–21, 2007.

SZABO, O. E. et al. Ultrasound-assisted extraction and characterization of hydrolytic and oxidative enzymes produced by solid state fermentation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 249–256, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant Physiology, Fifth Edition. **Cell**, v. 1, p. 782, 2010.

TANTHAPANICHAKOON, W.; JIAN, W. S. Bioethanol Production from Cellulose and Biomass-Derived Syngas. **Engineering Journal**, v. 16, n. 5, ISSN: 0125-8281, 2012.

TAPRE, A. R.; JAIN, R. K. Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 447–453, 2014.

TCHABO, W. et al. Ultrasound-assisted enzymatic extraction (UAEE) of phytochemical compounds from mulberry (*Morus nigra*) must and optimization study using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 214–225, 2015.

TERCI, D. B. L.; ROSSI, A. V. Indicadores naturais de pH: Usar papel ou soluções. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 684–688, 2002.

TIAN, Z. M. et al. Effects of ultrasound and additives on the function and structure of trypsin. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, n. 6, p. 399–404, 2004.

TOALDO, I. M. et al. 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**, v. 173, p. 527–535, 2015.

TODARO, A. et al. Increase of trans-resveratrol in typical Sicilian wine using β -glucosidase from various sources. **Food chemistry**, v. 107, n. 4, p. 1570–1575, 2008.

TRUHLAR, D. G. Transition state theory for enzyme kinetics. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 582, p. 10–17, 2015.

TUTORVISTA. **Phenolic Compounds**. Disponível em:
<<http://chemistry.tutorvista.com/organic-chemistry/phenolic-compounds.html>>.
Acesso em: 5 fev. 2017.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388–394, 2007.

UGLIANO, M. Enzymes in winemaking. In: **Wine chemistry and biochemistry**. Madrid: Springer, 2009. p. 103–126.

USSEGLIO-TOMASSET, L. Interventi e trattamenti nella produzione dei vini rosati per mezzo della macerazione carbonica. **Vini d'Italia**, Brescia, v. 28, n. 3, 1986.

VÁZQUEZ, E. S. et al. Effect of the winemaking technique on phenolic composition and chromatic characteristics in young red wines. **European Food Research and Technology**, v. 231, n. 5, p. 789–802, 2010.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic Compound Biochemistry**. 1 ed ed. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2006.

VINITUDE. **Conhecendo os vinhos pela cor**. Disponível em:
<<https://www.clubedosvinhos.com.br/conhecendo-os-vinhos-pela-cor/>>. Acesso em: 5 fev. 2017.

WANG, F. et al. Ultrasound-assisted extraction and purification of taurine from the red algae *Porphyra yezoensis*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 24, p. 36–42, 2015.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 6, p. 300–312, 2006.

WRIGHT, J. D.; WYMAN, C. E.; GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 75–90, 1988.

YACHMENEV, V. et al. Acceleration of the enzymatic hydrolysis of corn stover and sugar cane bagasse celluloses by low intensity uniform ultrasound. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 3, n. 1, p. 25–31, 2009.

YU, Z. L.; ZENG, W. C.; LU, X. L. Influence of ultrasound to the activity of tyrosinase. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 3, p. 805–809, 2013.

- ZHANG, X.; ZHANG, Y. P. Cellulases: Characteristics, sources, production, and applications. In: YANG, S.-T.; EL-ENSHASY, H. A.; THONGCHUL, N. (Eds.). . **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers**. First Edit ed. John Wiley & Sons, 2013. p. 131–146.
- ZHU, F. Impact of ultrasound on structure, physicochemical properties, modifications, and applications of starch. **Trends in Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 1–17, 2015.

CAPÍTULO II

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Uva

Para a realização dos experimentos foram utilizadas uvas da variedade Cabernet Sauvignon gentilmente cedidas pela Vitivinícola Jolimont (Canela, RS). As uvas foram previamente higienizadas com uma solução de NaClO (1 %) por 15 min, após, foram lavadas com água potável e armazenadas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o processamento.

3.1.2 Enzimas

Para a realização dos experimentos foram utilizados preparados enzimáticos comerciais com uso indicado para produção de sucos e vinhos, buscando a redução da viscosidade, aumento da extração, melhoramento dos processos de prensagem e filtração e aumento de compostos aromáticos.

Os preparados avaliados foram: Pectinex® Ultra SP-L (1), Pectinex® Ultra Color (2), Pectinex® Smash XXL (3), Novozym® 33095 (4), Pectinex® Ultra Clear (5) e Pectinex® BE XXL (6) - doados pela Novozymes (Espanha); Rohapect® 10L (7) - doado pela Amazon Group (Brasil); Lallzyme® Beta (8) - doado pela Lallemand Wine (França); e Zimopec® PX5 (9) – doado pela Vêneto Mercantil (Brasil).

As atividades enzimáticas declaradas pelos fornecedores estão apresentadas na Tabela 2, porém, uma caracterização completa foi realizada a fim de comprovar a atividade enzimática de cada preparado, tendo em vista que cada preparação possui uma composição enzimática.

Tabela 2 - Principais enzimas, atividades e microrganismo declarado pelos fabricantes.

Preparado Enzimático	Enzimas Declaradas	Atividades Declaradas	Microrganismo produtor
1-Pectinex® Ultra SP-L	PG	9500 PGU.mL ⁻¹	<i>A. aculeatus</i>
2-Pectinex® Ultra Color	PL/PG	10000 PECTU.mL ⁻¹	<i>A. aculeatus</i> / <i>A. niger</i>
3-Pectinex® Smash XXL	PL	30000 UPTE.mL ⁻¹	<i>A. niger</i>
4-Novozym® 33095	PL/PG	10000 PECTU.mL ⁻¹	<i>A. aculeatus</i> / <i>A. niger</i>
5-Pectinex® Ultra Clear	PG	7900 PGNU.mL ⁻¹	<i>A. niger</i>
6-Pectinex® BE XXL	PL/PG	16000 PECTU.mL ⁻¹	<i>A. niger</i>
7-Rohapect® 10L	Complexo de PE	70000 ADJU.mL ⁻¹	<i>A. niger</i>
8-Lallzyme® Beta	PL/PME/PG	5 U.g ⁻¹ /180 U.g ⁻¹ /590 U.g ⁻¹	<i>A. niger</i>
9-Zimopec® PX5	PE/HEM/PROT	-	<i>A. niger</i>

Legenda: PG: Poligalacturonase; PL: Pectinase; PE: Pectinase; HEM: Hemicelulase; PROT: Protease; PME: Pectinametilesterase. A.: *Aspergillus*.

3.1.3 Reagentes

Os reagentes utilizados ao longo do trabalho para realização das análises foram: pectina de maçã (grau de esterificação, 75 %); ácido poligalacturônico; ácido galacturônico; ácido gálico; ácido cafeico; ácido ferúlico; ácido cumárico; quercetina; cianidina e trolox (ácido-6-hydroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), adquiridos da Sigma Aldrich Co. Ltd. (São Paulo, Brasil). Ácido fórmico, acetonitrila, metanol de grau HPLC foram adquiridos da Panreac Quimica SL (Barcelona, Espanha). Os outros solventes e produtos químicos foram de grau analítico ou grau HPLC.

3.2 EQUIPAMENTOS

As análises foram realizadas em um banho de água agitado (MS) (MA-093, Marconi, Piracicaba, Brasil) (100 rpm), e em um banho ultrassônico (US) (Unique Inc., model USC 2800A, Brasil), com capacidade de 9,5 L e dimensões de 300 × 240 × 150 mm (comprimento × profundidade × altura), frequência de 40 kHz, e potência de 220 W. Ambos com controladores de temperatura.

3.3 EXTRAÇÃO DO MOSTO DE UVA

A extração do mosto foi realizada em escala laboratorial, seguindo os passos descritos a seguir:

- I. Previamente ao processamento, os cachos de uvas foram desengaçados e as bagas homogeneizadas manualmente.
- II. Foram pesados 50 g de uva em copo Becker com capacidade de 250 mL para realizar os ensaios de extração.
- III. As bagas foram esmagadas suavemente com o auxílio de um pistilo para o rompimento da película.
- IV. A cada Becker foram adicionados 0,5 mL de um solução enzimática diluída em tampão citrato pH 4,8 (50 mM) padronizada com base na sua atividade de pectinase total.
- V. Os frascos foram mantidos por determinado tempo e temperatura em banho agitado (mecânico ou ultrassom).
- VI. Após o tempo decorrido, foi procedida a extração dos sucos por prensagem.
- VII. As amostras foram submetidas às análises e armazenamento.

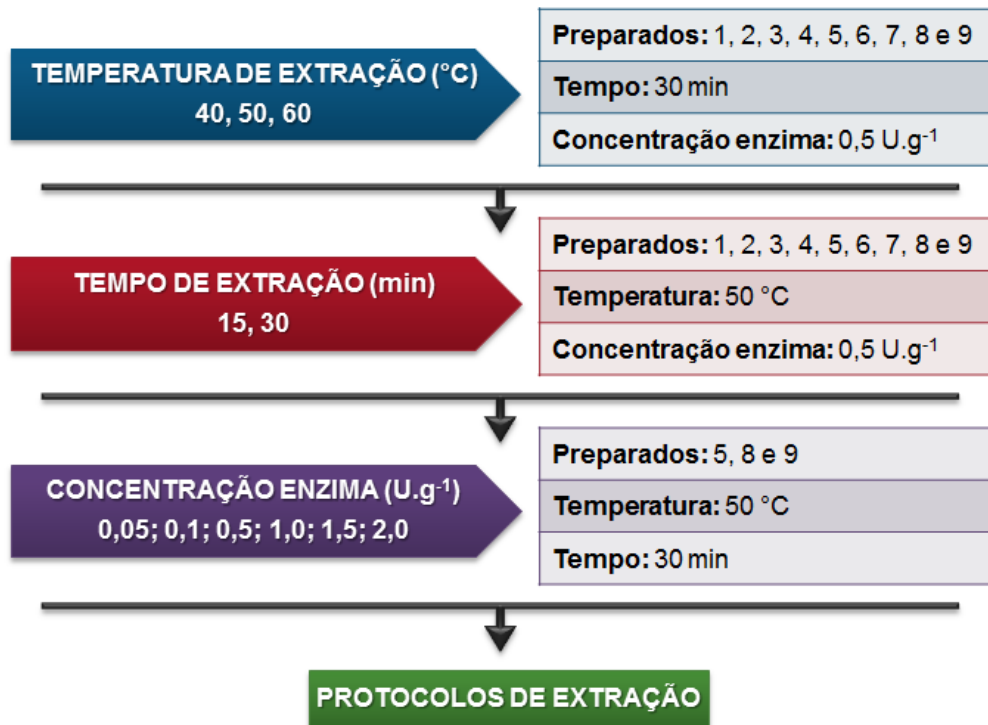
Como amostra controle, foi realizado um tratamento sem adição de enzima, ao qual a amostra foi submetida ao mesmo procedimento de extração.

3.3.1 Estudo dos parâmetros e protocolos de extração

A extração do mosto, utilizando diferentes preparados enzimáticos, foi avaliada no US e no MS, em diferentes tempos, temperaturas e concentração de enzima, como representado no fluxograma da Figura 19. Inicialmente foram avaliadas as temperaturas de extração de 40, 50 e 60 °C para todos os preparados, no MS e US. Após definida a temperatura ideal, os tempos de 15 e 30 min foram avaliados para todos os preparados.

Com base nos resultados obtidos, os preparados 5 (Pectinex® Ultra Clear), 8 (Lallzyme® Beta) e 9 (Zimopec® PX5) foram selecionados para avaliação da concentração de enzima (0,01 à 2,0 U.g⁻¹) ideal para extração sob tais condições.

Figura 19 – Fluxograma dos experimentos de extração do mosto.



Tendo em vista os resultados obtidos nos ensaios anteriores, foram estabelecidos oito protocolos (Tabela 3) para avaliação da extração do mosto conduzida no banho agitado (MS) e no ultrassom (US). Nesse estudo a extração foi conduzida a 50 °C por 30 min, utilizado o preparado Zimopec® PX5 na concentração de 1 U.g⁻¹ considerando a atividade de pectinase total.

Tabela 3 - Protocolos de extração para extração do mosto de uva.

Código	Descrição
MS - 0	30 min no banho agitado sem enzima
MS - E	30 min no banho agitado com enzima
US - 0	30 min no Ultrassom sem enzima
US - E	30 min no Ultrassom com enzima
MSUS - 0	15 min no banho agitado + 15 min no ultrassom – sem enzima
MSUS - E	15 min no banho agitado + 15 min no ultrassom – com enzima
USMS - 0	15 min no ultrassom + 15 min no banho agitado – sem enzima
USMS - E	15 min no ultrassom + 15 min no banho agitado – com enzima

3.4 DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA ENZIMÁTICA

Foi realizada a determinação da cinética enzimática das enzimas pectinase, xilanase e celulase para o preparado Zimopec PX5®. Diferentes concentrações dos substratos foram avaliados (pectina 0,1 – 10 mg.mL⁻¹; papel filtro 2,5 – 100 mg.mL⁻¹; e xilana 1 – 25 mg.mL⁻¹). Os ensaios de atividade enzimática foram realizados no banho agitado e no ultrassom conforme descrito na sessão 3.8.1.

A cinética das reações catalisadas pelas enzimas obedece à equação de Michaelis-Menten (Equação 2), onde foram calculadas a velocidade máxima (V_{max}) e a constante de Michaelis (K_m) relacionando os valores de velocidade inicial com a concentração de substrato. Os valores de V_{max} e K_m foram estimados através da regressão não-linear utilizando o algoritmo de Levenberg-Marquardt no programa *Statística 12*. A eficiência catalítica (V_{max}/K_m) foi avaliada relacionando a velocidade máxima com a constante de Michaelis.

3.5 ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS TERMODINÂMICOS

Os parâmetros termodinâmicos foram estudados para pectinase, celulase e xilanase na faixa de temperatura de 30 a 60 °C. A energia de ativação (E_a) foi determinada graficamente por regressão linear do logaritmo de $\ln(k)$ da constante de reação pelo inverso da temperatura absoluta $1/T$ (K⁻¹), de acordo com a equação de Arrhenius (8):

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (8)$$

A = Fator pré-exponencial

T = Temperatura absoluta (K)

R = Constante universal dos gases (8,314 J.mol⁻¹ K⁻¹)

Os valores de entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) foram obtidos através da inclinação e interceptação do gráfico $\ln(k/T)$ versus $1/T$, e calculados, assim como a energia livre de Gibbs (ΔG), de acordo com a teoria de estado de transição de Eyring (Equação 9).

$$k = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right) = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}\right) \quad (9)$$

T = Temperatura absoluta (K)

k_B = Constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$)

h = Constante de Planck ($6,6256 \times 10^{-34} \text{ J.s}^{-1}$).

R = Constante universal dos gases ($8,314 \text{ J.mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

Onde, T é a temperatura absoluta (K), k_B é a constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) e h é a constante de Planck ($6,6256 \times 10^{-34} \text{ J s}^{-1}$). O ΔH foi calculado utilizando a energia de inativação, como demonstrado na equação 10, e o ΔG através da equação 11.

$$\Delta H = E_a - RT \quad (10)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (11)$$

3.6 INFLUÊNCIA DO pH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para avaliar a influência do pH sobre a atividade de pectinase, celulase e xilanase, a atividade enzimática do preparado Zimopec PX5® foi determinada conforme descrito no item 3.8.1, no banho agitado (MS) e no ultrassom (US), variando o pH entre 3 e 7 com os tampões citrato de sódio (50 mM) (pH 3 – 5) e fosfato de sódio (50 mM) (pH 6 – 7).

3.7 PRÉ-SONICAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE ENZIMA E SUBSTRATO

Esse estudo foi conduzido com o preparado Zimopec PX5®, onde foram avaliadas as atividades de pectinase, celulase e xilanase conforme descritos no item 3.8.1. Soluções de enzima e substrato (em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8) foram sonicadas individualmente, por diferentes tempos a fim de verificar o efeito isolado da sonicação na reação enzimática. Inicialmente as soluções foram sonicadas por 0; 1; 5; 10; 15 e 30 min, sendo retiradas alíquotas ao decorrer do tempo para realização da reação enzimática no MS e US. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

3.8 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

3.8.1 Determinação da atividade enzimática

3.8.1.1 Atividade de pectinase total

A atividade de pectinase total (PE) foi determinada através da liberação de agentes redutores pela hidrólise de uma solução de pectina de maçã (grau de esterificação de 75 %).

Substrato: Pectina (1 g.L^{-1}) diluída em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8.

Reação de hidrólise:

- Adição de 0,9 mL do substrato a tubos de ensaio;
- Incubação em banho de agitação a 37 °C;
- Adição de 0,1 mL de solução enzimática; tempo de reação de 1 min;
- Transferência dos tubos de ensaio para banho gelado para interromper a reação;
- Adição de 1 mL de solução de ácido dinitrosalicílico (DNS);
- Fervura dos tubos por 5 min;
- Leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm.

Os valores de absorbância encontrados foram convertidos em concentração através da curva de calibração construída com soluções de ácido galacturônico, entre 0,2 a 1,2 mg.L^{-1} . 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 por mililitro (U.mL^{-1}). A atividade de PE foi calculada utilizando a Equação 3.

- Cálculo da determinação da atividade U (mg.mL^{-1}).

$$U(\text{mg.mL}^{-1}) = \frac{[P] \times V_R \times F_D}{T \times V_E} \quad (3)$$

[P] = Concentração de produto;
 V_R = Volume da reação;
 F_D = Fator de diluição;
 T = Tempo de reação;
 V_E = Volume enzima.

3.8.1.2 *Atividade de poligalacturonase*

A atividade de poligalacturonase (PG) foi determinada através da hidrólise do ácido poligalacturônico e quantificação dos grupos redutores liberados.

Substrato: Ácido Poligalacturônico (1 g.L^{-1}) diluído em tampão de citrato de sódio 50 mM, pH 4,8.

Reação de hidrólise:

- Adição de 0,9 mL do substrato a tubos de ensaio;
- Incubação em banho agitado a 37 °C;
- Adição de 0,1 mL de enzima; tempo de reação de 2 min;
- Transferência dos tubos de ensaio para banho com gelo para interromper a reação;
- Adição de 1 mL da solução de DNS;
- Fervura dos tubos por 5 min;
- Leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm.

Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de ácido galacturônico através da curva de calibração construída conforme citado anteriormente. Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar $1 \mu\text{mol}$ de ácido galacturônico por minuto. A atividade de PG foi calculada pela Equação 3.

3.8.1.3 *Atividade de celulase total*

A atividade de celulase total (CE) foi determinada pela hidrólise da celulose, e liberação de açúcares redutores, seguindo o método proposto por Ghose (1987).

Substrato: Papel filtro Whatman N°1.

Reação de hidrólise:

- Pesagem de 50 mg de papel filtro em tubos de ensaio;
- Adição de 0,5 mL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8;
- Incubação em banho agitado a 50 °C;
- Adição de 0,5 mL de enzima; tempo de reação de 5 min;
- Transferência dos tubos de ensaio para banho com gelo para interromper a reação;

- Adição de 1 mL da solução de DNS;
- Fervura das amostras durante 5 min;
- Leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm.

Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de glicose através da curva de calibração construída com soluções de glicose, entre 0,2 a 1,2 mg.L⁻¹, analisadas pelo método de DNS proposto por Miller (1959). Uma unidade de CE foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de glicose por minuto. A atividade de CE foi calculada pela Equação 3.

3.8.1.4 *Atividade de xilanase*

A atividade de xilanase (XLN) foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir de solução de xilana “birchwood”, conforme descrito por Bailey, Biely e Poutanen (1992) com modificações.

Substrato: Xilana 1% diluída em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0.

Reação de hidrólise:

- Adição de 0,9 mL do substrato em tubos de ensaio;
- Incubação em banho agitado a 50 °C
- Adição de 0,1 mL de enzima; tempo de reação de 5 min;
- Transferência dos tubos de ensaio para banho com gelo para interromper a reação;
- Adição de 1 mL da solução de ácido dinitrosalicílico (DNS);
- Fervura durante 5 min;
- Leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm.

Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de xilose através da curva de calibração construída com soluções de xilose, nas concentrações de 0,2 a 1,0 g.L⁻¹, analisadas pelo método do DNS proposto por Miller (1959). Uma unidade de atividade enzimática de XLN foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcares redutores, expressos como xilose por minuto, sendo a atividade enzimática expressa em U.g⁻¹. A atividade de XLN foi calculada através da Equação 3.

3.8.1.5 Atividade de pectinaliase

A atividade de pectinaliase (PL) foi determinada espectrofotometricamente pela medida do aumento da absorbância em 235 nm, devido à formação de produtos não saturados, conforme descrito por Albersheim e Killias (1962) com modificações.

Substrato: Pectina (4 g.L^{-1}) diluída em tampão de citrato de sódio 50 mM, pH 4,8.

Reação de hidrólise:

- Adição de 0,95 mL do substrato a tubos de ensaio;
- Incubação em banho agitado a 37 °C;
- Adição de 0,05 mL da enzima diluída; tempo de reação de 1 min;
- Adição de 3 mL de HCl 0,5 M para interromper reação;
- Leitura da absorbância em espectrofotômetro a 235 nm.

Uma unidade de PL foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 μmol de uronideo insaturado ($\epsilon = 5500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) por min, nas condições da reação. A atividade de pectinaliase foi calculada utilizando a Equação 4.

- Cálculo da determinação da atividade de PL ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).

$$U(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) = \frac{[P] \times V_R \times F_D}{T \times V_E \times 5500 \times 1} \quad (4)$$

[P] = Concentração de produto;

V_R = Volume da reação;

F_D = Fator de diluição;

T = Tempo de reação;

V_E = Volume enzima

3.8.1.6 Atividade de pectinametilesterase

A atividade de pectinametilesterase (PMGE) foi determinada por titulação de grupos carboxílicos liberados através da desesterificação da pectina, de acordo com o método descrito por Rouse e Atkins (1952) com modificações.

Substrato: Pectina (5 g.L^{-1}) diluído em tampão NaCl ($0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 4,5).

Reação de hidrólise

- Adição de 9,9 mL de substrato em tubos de ensaio;
- Incubação em banho agitado a 30 °C;
- Adição de 0,1 mL da enzima diluída; tempo de reação de 10 min;
- Titulação com NaOH (0,02 M) até pH 4,5.

Um U de PME foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 miliequivalente de grupos carboxil por minuto, calculada conforme equação 5.

$$U(\text{mg. mL}^{-1}) = \frac{V_T \times M_{\text{NaOH}} \times V_R \times F_D}{T \times V_E} \quad (5)$$

V_T = Volume titulação;
 M_{NaOH} = Concentração Molar de NaOH;
 V_R = Volume da reação;
 F_D = Fator de diluição;
 T = Tempo de reação;
 V_E = Volume enzima

3.8.2 Cálculo do rendimento de extração

O rendimento de extração de cada tratamento foi expresso em porcentagem de massa de mosto pela massa inicial de uva, como descrito na equação (6) seguinte:

$$\text{Rendimento \%} = \frac{\text{Massa do mosto}}{\text{Massa inicial de uva}} \times 100 \quad (6)$$

3.8.3 Determinação dos sólidos solúveis totais

Os sólidos solúveis totais foram determinados em um refratômetro portátil a $20,0 \pm 0,5$ °C e expressos em °Brix.

3.8.4 Açúcares redutores

Os açúcares redutores foram quantificados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), proposto por Miller (1959). Para reação, foi adicionado 1 mL

de DNS para 1 mL de amostra. A solução foi então incubada a 100 °C por 5 minutos, e em seguida resfriada em banho de gelo. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro a 540 nm. 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.

3.8.5 Acidez total

A acidez total corresponde à soma dos ácidos orgânicos tituláveis, ácido tartárico, málico e cítrico, quando se neutraliza o mosto a pH 7 com solução alcalina.

Para determinação da acidez total titulável, o mosto foi titulado com uma solução de NaOH (0,1 M) até pH 8,2, utilizando fenolftaleína como indicador, sendo expressa em g.L⁻¹ de ácido tartárico. Os valores de NaOH gastos em cada amostra foram convertidos em gramas por litro de ácido tartárico, utilizando a equação 7.

$$At = \frac{n \times M \times 1000 \times 0,075}{V} \quad (7)$$

At = Acidez total (g.L⁻¹ de ácido tartárico)

n = Volume gasto de NaOH (mL)

M = Molaridade da solução de NaOH (mol.L⁻¹)

V = Volume de amostra (mL)

3.8.6 pH

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

3.8.7 Capacidade redutora

A capacidade redutora (RC) foi determinada através do método de Folin-Ciocalteu proposto por Singleton e Esau (1968), com modificações. Para reação, foram adicionados a tubos de ensaio: 20 µL de amostra, com 1,68 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e 300 µL de tampão de carbonato de sódio. A reação foi mantida por 2 h no escuro, após o tempo, a absorvância foi medida em espectrofotômetro a

765 nm. Os valores de absorvância 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⁻¹. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (mg) por litro de suco (mg.L⁻¹).

3.8.8 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante (AA) foi determinada pelo método de descoloração do radical livre ABTS descrito por Re et al. (1999). A solução radical ABTS foi diluída com etanol: água (50:50, v/v) para obter uma absorvância de 0,70 (± 0,02) à 750 nm. O mosto foi diluído em etanol buscando produzir inibição da absorvância inicial de ABTS entre 20 - 80 %.

Uma alíquota de 300 µL da amostra foi adicionada a 2,7 mL da solução de radical ABTS e a diminuição de absorvância a 750 nm foi registrada durante 6 minutos em um espectrofotômetro. Através da diferença entre as absorvâncias inicial e final foi obtido o percentual 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), entre 5 a 50 mM. Os resultados foram expressos como equivalentes de Trolox (mM) por litro de mosto de uva.

3.8.9 Determinação parâmetros de cor

A determinação da cor das amostras de mosto foi realizada com um Colorímetro Minolta (Modelo CR-400, Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japão), segundo Tiwari et al. (2010). Foram medidos três parâmetros de cores: L^* luminosidade, que varia de 0 a 100 (preto/branco); a^* intensidade de vermelho/verde (+/-); b^* , intensidade de amarelo/azul (+/-). Esses valores foram utilizados para calcular o parâmetro ΔE^*_{ab} , que expressa a diferença de cor, através da fórmula; $\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$.

3.8.10 Análise 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 utilizando um HPLC Shimadzu (Kyoto, Japão). A separação analítica foi realizada em uma coluna C-18 de fase reversa (4 μm , 250 x 4,6 mm). Antes de realizar a análise, as amostras foram diluídas, centrifugadas (15000 x *g* por 10 min a 4 °C), e filtradas em membrana de acetato de celulose (0,22 μm) (Millipore, Massachusetts, EUA).

Como fase móvel, foram utilizadas duas soluções: (A) água ultrapura, contendo 0,5 % de ácido fórmico; e (B) acetonitrila contendo 0,5 % de ácido fórmico, em gradiente linear entre as soluções. Inicialmente foi utilizado uma proporção A/B de 99:1, 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, sendo mantida por mais 5 min, e então voltando para condição inicial de 99:1 para A/B. Os cromatogramas foram processados a 280 nm, 320 nm, 360 nm e 520 nm.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando a ANOVA e o teste de Tukey com nível de significância de 0,05 utilizando o software *Statistica 12* (StatSoft, Inc.).

3.10 REFERÊNCIAS CAPÍTULO II

ALBERSHEIM, P.; KILLIAS, U. Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase. **Archives of biochemistry and biophysics**, 1962. v. 97, n. 1, p. 107–115.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of biotechnology**, 1992. v. 23, n. 3, p. 257–270.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied chemistry**, 1987. v. 59, n. 2, p. 257–268.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, 1959. v. 31, n. 3, p. 426–428.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, 1999. v. 26, n. 9, p. 1231–1237.

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**, 2013. v. 61, n. 12, p. 3022–3029.

ROUSE, A. H.; ATKINS, C. D. Heat inactivation of pectinesterase in citrus juices. **Food technology**, 1952. v. 6, n. 8, p. 291–294.

SINGLETON, V. L.; ESAU, P. Phenolic substances in grapes and wine, and their significance. **Advances in food research. supplement**, 1968. v. 1, p. 1–261.

CAPÍTULO III

4 ARTIGO I

Combination of ultrasound, enzymes and mechanical stirring: a new method to improve *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon must yield, quality and bioactive compounds

Neste trabalho nove preparados enzimáticos comerciais foram caracterizados e avaliados para extração de mosto da uva Cabernet Sauvignon. Foram avaliados 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, submetido para publicação na revista *Food and Bioproducts Processing*.

Combination of ultrasound, enzymes and mechanical stirring: a new method to improve *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon must yield, quality and bioactive compounds

Luíza M. G. Dalagnol¹, Lucas Dal Magro¹, Vitória C. C. Silveira¹, Eliseu Rodrigues²,
Vitor Manfroi³, Rafael C. Rodrigues^{1,*}

¹Biotechnology, 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.

²Laboratory of Natural Antioxidants, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul.

³Beverages Technology Lab, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul.

* Corresponding author: Prof. Dr. Rafael C. Rodrigues, rafaelcrodrigues@ufrgs.br - www.ufrgs.br/bbb

ABSTRACT

In this work the effects of ultrasound (US), mechanical stirring (MS) and nine commercial enzyme preparations (EP) were investigated on *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon must extraction (GME). Yield, quality parameters and bioactive compounds were analyzed for individual and combined extraction techniques. The EP Zimopec PX5® presented the best results at the concentration of 1.0 U.g⁻¹ of pectinase, 50 °C and 30 min. Compared to MS, US improved the extraction yield, anthocyanin content, color and soluble solids, while the combined techniques (US+MS) with enzyme improved yield, antioxidant activity and color in 7.1 %, 30.2 % and 9.6 % respectively. The extraction process resulted from the combination of ultrasound, mechanical stirring and enzyme, enhanced the extraction quality and also showed a synergistic and positive effect on grape must extraction.

Keywords: Ultrasound; Enzymes; Mechanical stirring; Grape must extraction; Phenolic compounds; Antioxidant activity.

HIGHLIGHTS

- Ultrasound, enzymes and mechanical stirring combined were investigated for grape must extraction.
- Ultrasound, mechanical stirring and enzyme increased 41.5 % anthocyanin content.
- Combination of ultrasound, enzyme and mechanical stirring improved must yield and quality.
- Proposed process is a good alternative for thermomaceration.

1 INTRODUCTION

Grape and its derivatives, such as wine and juice, are renowned by the high content of bioactive compounds which present positive effects on human health,¹⁻³ as well as contribute to the wine quality parameters like color, astringency and ageing ability. However, their presence on the final product depends of some factors, as grape variety, maturity stage and the winemaking techniques.⁴

The extraction process is one of the most important stages of winemaking and juice production, since it affects directly the product quality and, therefore, the industry incomes.⁵ Some treatments could be employed to aid the extraction process, as the use of enzymatic preparations containing pectinases (EC 3.2.1.15 - (1→4)- α -D-galacturonan glycanohydrolase), cellulases (EC 3.2.1.4 - 4-(1,3;1,4)- β -D-glucan 4-glycanohydrolase) and hemicellulases (EC 3.2.1.8 - 1,4-beta-D-Xylan xylanohydrolase). These enzymes catalyze the hydrolysis of structural polysaccharides from plant cell wall, improving the must extractability, and facilitating the release of bioactive compounds.^{4,7}

Microwave assisted extraction,⁸ pulsed electric field^{9,10} and flash vacuum expansion¹¹ have been studied as alternative techniques to improve the extraction process, however, these techniques may induce irreversible denaturation of some bioactive compounds due the high intensity of the process.^{12,13}

Ultrasound (US) is an emerging and promising technology that has been widely used to improve the efficiency of various chemical, physical and biotechnological processes on food industry,^{14,15} minimizing processing time, enhancing quality and ensuring the safety of food products.^{16,17} The main effect of US on liquid medium is the physical phenomenon of acoustic cavitation,^{18,19} which consists on the formation, growth and implosion collapse of microbubbles dissolved in the liquid.¹⁴ Cavitation could provide potential benefits to the extraction process, as mass transfer intensification, improvement on solvent penetration into plant tissue, and increase on substrate availability.^{13,20}

Some studies have shown controversial results about the efficiency of combined treatments of enzyme and ultrasound. It is already know that enzyme

characteristics and sonication parameters, such as processing time, acoustic power and frequency, and wave duty cycle, have a significant effect on enzyme stability, interfering on its activity.²¹ High-intensity US, especially if applied at high temperature and long time, could inactivate the enzymes,^{22,23} as well as the action of free radicals and hydrogen peroxide, derivatives from ultrasound chemical effects.¹⁵ Under these conditions, sonication could cause the breakdown of hydrogen bonding and Van der Waals interactions in the polypeptide chains, modifying the enzyme structure, losing the catalytic activity.²³ However, low-intensity, US may increase the enzyme activity, as it accelerates the transport of substrates and reaction products to and from enzymes, enhancing the mass transfer,^{23,24} reducing the maceration time and increasing extraction yield.²⁵

In this work, for the first time the combined effects of ultrasound, enzymatic treatment and mechanical stirring were studied on *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon grape must extraction (GME). Initially, nine commercial enzymatic preparations (EP) were characterized regarding their activities, and evaluated their application on GME, evaluating the enzyme concentration, time and temperature of extraction on ultrasound (US) and mechanical stirring (MS). Also, the quality parameters (total soluble solids, pH, yield, reducing sugars, titratable acidity, color parameters, anthocyanin concentration and antioxidant activity) were analyzed for GME extracted by US and MS, individually or in combination. Finally, the phenolic compounds and anthocyanins extracted were identified by high performance liquid chromatograph with diode array detector and mass spectrometry (HPLC-DAD-MS).

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Chemicals

The enzymes preparations (EP) Pectinex Ultra SP-L® (1), Pectinex Ultra Color® (2), Pectinex Smash XXL® (3), Novozym 33095® (4), Pectinex Ultra Clear® (5), Pectinex BE XXL® (6) were kindly donated from Novozymes (Spain). Rohapect 10L® (7) was from Amazon group (Brazil), Lallzyme Beta® (8) was from Lallemand Wine (France), and Zimopec PX5® (9) was from Vêneto Mercantil (Brazil).

Ultra-pure water was obtained by the Milli-Q water purifier system from Millipore (Bedford, MA, USA). Gallic acid, galacturonic acid, polygalacturonic acid, pectin from apple, xylan from beechwood, cyanidin, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), and Folin-Ciocalteu reagent were from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). HPLC solvents, formic acid, acetonitrile and methanol (Panreac Quimica SL, Barcelona, Spain) were filtered through Millipore membranes of 0.45 µm.

2.2 Sample

Grapes from *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon variety were kindly donated by Vitivinicola Jolimont (Canela, RS, Brazil). The bunches were sanitized and stored at -18 °C until their use.

2.3 Enzymatic activities

Total pectinase (PE), polygalacturonase (PG), pectin lyase (PL), pectin methyl esterase (PME) and cellulase (CE) activities were determined as described by Dal Magro et. al.²⁸ Xylanase (XLN) activity was determined following the methods proposed by Bailey & Biely et al.²⁹ using xylan (1 %) prepared in sodium acetate buffer (50 mM, pH 5) as substrate. The reaction was carried out for 5 min at 50 °C, under agitation, and the amount of reducing groups formed was estimated by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method proposed by Miller.³⁰ One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to generate 1 µmol of reducing groups, expressed as xylose, per minute under standard assay conditions.

2.4 Grape Must Extraction

Initially, grape bunches were destemmed and slightly mixed to obtain a homogeneous sample, then, 50 g of grape berries were gently crushed and used to grape must extraction (GME). To the enzymatic treatment, 0.5 mL of enzyme solution was added to grape samples and the extraction was carried out in an ultrasound and/or mechanical stirring equipment. Controls without enzyme were performed for each technique. At the end, the grape must was pressed, analyzed and stored under refrigeration.

Mechanical stirring extraction was carried out in an agitated water bath (MA-093, Marconi, Piracicaba, Brazil), and ultrasound extraction was performed using an ultrasonic bath (Unique Inc., model USC 2880A, 40 kHz, 220 W, Brazil).

2.4.1 Study of extraction parameters

Initially, GME were evaluated on MS and US with all enzyme preparations varying extraction temperature (40, 50 and 60 °C) by 30 min, then, the extraction time (15 and 30 min) was evaluated on GME at 50 °C.

Based on the previous results, the enzyme concentration (0.01 to 2.0 U.g⁻¹ of PE activity) for GME was evaluated for the EP 5, 8 and 9.

2.4.2 Determination of the extraction protocol

Eight different protocols (Table 1) were tested to grape must extraction performed on MS, US and combination of both, using Zimopec PX5 (1 U.g⁻¹), at 50 °C for 30 min.

Table 1: Extraction protocols for grape must extraction.

Experiment Code	Extraction protocol
MS - 0	30 min under Mechanical stirring
MS - E	30 min under Mechanical stirring + enzyme
US - 0	30 min under Ultrasound
US - E	30 min under Ultrasound + enzyme
MSUS - 0	15 min under Mechanical stirring + 15 min under Ultrasound
MSUS - E	15 min under Mechanical stirring + 15 min under Ultrasound + enzyme
USMS - 0	15 min under Ultrasound + 15 min under Mechanical stirring
USMS - E	15 min under Ultrasound + 15 min under Mechanical stirring + enzyme

2.5 Analytical methods

2.5.1 *Extraction yield*

The extraction yield of each treatment was expressed as percentage of mass of must per initial mass of grape as described in the Eq. 1:

$$\text{Yield \%} = \frac{\text{Mass of must}}{\text{initial mass of grapes}} \times 100 \quad (1)$$

2.5.2 *Reducing sugars, soluble solids, acidity and pH*

Reducing sugars were determined by the DNS method as proposed by Miller.³⁰ Titratable acidity was carried out by titration with 0.1 N NaOH with phenolphthalein as indicator and expressed in (g.L⁻¹) of tartaric acid. Total soluble solids (TSS) expressed in °Brix, were measured with a refractometer at 20.0±0.5 °C, and pH was measured by a digital pHmeter.

2.5.3 *Antioxidant Capacity*

Antioxidant capacity was measured by two methods: reducing capacity (RC), determined by Folin–Ciocalteu method³¹ and antioxidant activity (AA) by ABTS method.³² RC was determined adding 300 µL of sodium carbonate buffer 20 % (w/v) at 1.68 mL of Folin–Ciocalteu reagent with 20 µL of the extracted sample. The reagents were mixed and left in the dark for 2 h. Afterwards, the absorbance at 765 nm was measured in a spectrophotometer, and the results were expressed as equivalents of gallic acid (mg) per milliliter of grape juice.

To AA analysis, the samples were diluted to produce between 20 and 80 % of inhibition from initial ABTS absorbance. An aliquot of 300 µL 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 curve and the results were expressed as equivalents of Trolox (mmol) per liter of grape must.

2.5.4 Determination of color properties

Color parameters were determined using a Konica Minolta Colorimeter (CR-400, Osaka Japan) and the data expressed as L^* (lightness/brightness), a^* (redness/greenness) and b^* (yellowness/blueness). These values were used to calculate the color difference (ΔE^*_{ab}), ($\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$).

2.5.5 Determination of phenolic compounds

The identification of phenolic compounds was carried out in a high performance liquid chromatograph (HPLC) (Shimadzu HPLC, Kyoto, Japan) equipped with two pumps (model LC-20AD), on-line degasser (DGU-20A), column oven (CTO-20A), automatic injection system (SIL-20AHT), diode array detector (SPD-M20A) and, connected in series to a mass spectrometer with a q-TOF analyzer and electrospray ionization (ESI) source (Bruker Daltonics, model micrOTOF-QIII, Bremen, Germany). Quantitative analysis was carried out in a HPLC (Shimadzu HPLC, Kyoto, Japan) equipped with quaternary pumps (LC-20AD), on-line degasser (DGU-20A), rheodyne injection valve with a 20 μ L loop, and a diode array detector (DAD) (SPD-M20A). Before analysis, the grape must samples were centrifuged at 10000 g for 5 min. The supernatant was filtrated in 0.22 μ m cellulose acetate membrane filter (Millipore, Massachusetts, USA), and injected (20 μ L) into the HPLC-DAD-MS or HPLC-DAD.

Phenolic compounds separation was performed according to a method described by Rodrigues et al.³³ in a C_{18} Phenomenex column (4 μ m, 250 \times 4.6 mm i.d.) connected to a guard column (4 μ m, 4 \times 3 mm i.d.) using a mixture composed of water:formic acid (99.5:0.5, v/v) (A) and acetonitrile:formic acid (99.5:0.5, v/v) (B) as mobile phase. The gradient was programmed as follow: A:B, 99:1 to 50:50 in 50 min; then from 50:50 to 1:99 in 5 min, and the former ratio (1:99) was maintained for additional 5 min. The flow rate was 0.7 mL.min⁻¹ and the oven temperature was set at 40 °C. The UV-vis spectra were obtained between 200 and 800 nm and the chromatograms were processed at 280 nm (flavan-3-ols), 320 nm (hydroxycinnamic acids), 360 nm (flavonols), and 520 nm (anthocyanins).

The mass spectrum parameters were set as follows: ESI source in positive and negative ionization modes; capillary voltage, 2000 V (positive) or -3000 V (negative); end plate offset, -500 V; drying gas (N₂) temperature 310 °C; flow rate of 0.7 mL.min⁻¹; nebulizer gas, 2 bar; scan range, 100 - 1200 m/z. MS² were set in automatic mode applying a fragmentation energy of 34 eV. Phenolic compounds were tentatively identified according to the elution order and retention time in the reversed phase column, UV-vis, MS spectra features and data available in the literature.³⁴⁻³⁸

Quantification was performed using external ten-point analytical curves for cyanidin 3-O-glucoside (0.3 - 1.0 µg.mL⁻¹), quercetin (4.4 - 13.3 µg.mL⁻¹), caffeic acid (0.4 - 1.3 µg.mL⁻¹), coumaric acid (1.0 - 3.0 µg.mL⁻¹), ferulic acid (0.3 - 1.0 µg.mL⁻¹), kaempferol (0.3 - 58.2 µg.mL⁻¹) and epicatechin (0.48 - 192.4 µg.mL⁻¹).

2.6 Statistical analysis

The experimental data were analyzed with the ANOVA and Tukey test with significant level of 0.05 using the software Statistica 12 (StatSoft, Inc.).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Enzymatic activity

Initially, the enzymatic preparations were characterized regarding their activities of pectinase, polygalacturonase, pectin lyase, pectin methyl esterase, cellulase and xylanase. The results are reported in Table 2. The pectinolytic enzymes (PE, PG, PME and PL) were the main activities for all preparations, highlighting the preparations 5 and 9 with the highest values of total pectinase activity.

Table 2: Enzymatic activities for each enzyme preparation.

Enzyme preparation	Enzyme activity					
	PE	PG	PL	PME	CE	XLN
*1 - Pectinex Ultra SP- L ®	969	1649	20	280	19	855
*2 - Pectinex Ultra Color ®	1971	1484	173	1180	31	6437
*3 - Pectinex Smash XXL ®	1915	505	429	0	15	769
*4 - Novozymes 33095 ®	2212	1701	182	913	40	8098
*5 - Pectinex Ultra Clear ®	2275	2306	218	960	50	11396
*6 - Pectinex BE XXL ®	2064	1135	316	413	29	2699
*7 - Rohapect 10L ®	1720	1845	153	467	35	5956
**8 - Lallzyme Beta ®	3899	1313	94	0	976	7621
**9 - Zimopec PX5 ®	9393	1482	94	0	1311	1083

*Enzyme activity in U.mL⁻¹; **Enzyme activity in U.g⁻¹.

Moreover, the EP 4, 5, 8 and 9 also showed high values for xylanase and cellulase activities, and Zimopec PX5® (EP 9) presented the highest enzymatic activities for the main maceration enzymes analyzed (PE, CE and XLN). Nevertheless, all EP presented a mixture of different enzymes and showed suitable values and ratios for all enzymatic activities, being essential the knowledge of the exact activities for each preparation for a correct application. In order to compare the nine enzyme preparations on GME, the extraction was conducted using 0.5 U of total pectinase activity per gram of grape as suggested in a previous study by Dal Magro et al.²⁸

3.2 Effects of extraction conditions on grape must parameters

Initially, the extraction temperature ranged from 40 to 60 °C for GME with all the enzymatic preparations at both agitation methods (US and MS). The extraction was conducted by 30 min, measuring the extraction yield, total soluble solids (TSS) and reducing capacity (RC), and the results are presented in Table 3.

Significant differences on physicochemical properties were observed with temperature variation. TSS and RC increased at higher temperatures for both agitation methods, and were statistically equal at 50 °C and 60 °C. The increase on antioxidant capacity at higher temperatures agrees with previous studies,^{39,40} where the enhancement on antioxidant capacity were possibly correlated to the higher extraction of phenolic compounds by thermal treatments. On the other hand, higher extraction yields were achieved at the lowest temperature (40 °C), however, no statistical differences were found to yield of extraction by US between 40 and 50 °C.

The extraction by ultrasound achieved higher values for yield, RC and TSS when compared to MS performance. Ultrasound and enzyme treatment provided an enhancement on extraction yield and grape must quality, and also allowed the use of milder processing conditions, as a lower extraction temperature. Therefore, for a good correlation between yield and quality, we selected 50 °C for the subsequent analysis.

Then, processing time was also evaluated to all enzyme preparations on GME varying time of extraction on US and MS by 15 and 30 min at 50 °C, and the results are shown in Figure 1. Significant differences on physicochemical properties were observed on the different extraction times. The RC and TSS increased with time for both agitation methods, but the yield of extraction was statistically equal in both times. However, compared to MS, US improved yield and RC. It has been reported that the enzyme treatment for fruit extraction varied from 45 min³⁹ to 8 h⁴¹, whereas, the extraction time was shorter in our study, and it was improved by ultrasound treatment, probably due the cavitation effects, that could enhance the cell wall lyse, favoring the enzymatic activity.^{24,27} Considering the better values of RC and TSS, 30 min was chosen for the subsequent assays of grape must extractions.

Table 3: Effect of temperature on yield, total soluble solids, and reducing capacity of grape must treated with nine commercial enzymatic preparations (EP) at mechanical stirring (MS) and ultrasound extraction (US).

EP	Yield (%)						Total soluble solids (° Brix)						Reducing capacity (mg.mL ⁻¹)					
	US			MS			US			MS			US			MS		
	40 °C ^a	50 °C ^a	60 °C ^b	40 °C ^a	50 °C ^b	60 °C ^b	40 °C ^b	50 °C ^b	60 °C ^a	40 °C ^c	50 °C ^b	60 °C ^a	40 °C ^b	50 °C ^a	60 °C ^a	40 °C ^b	50 °C ^a	60 °C ^a
0	68.1	65.9	62.9	68.4	60.1	59.0	18.8	19.4	19.5	17.0	18.9	19.0	10.2	14.7	12.8	3.07	9.74	9.99
1	73.2	71.6	68.3	71.3	64.8	64.6	18.6	19.0	19.1	17.0	19.0	20.0	7.73	13.0	10.2	6.00	10.1	10.5
2	73.1	72.7	69.4	71.6	64.9	64.3	19.0	19.0	20.0	16.5	19.1	20.0	8.02	12.2	12.7	6.02	10.6	9.65
3	73.4	70.6	69.8	70.9	65.0	65.5	18.5	19.2	20.1	17.0	19.1	20.0	8.67	14.0	11.7	5.87	10.6	12.8
4	71.7	71.4	68.8	72.3	65.0	66.2	18.7	19.5	20.0	17.0	19.3	20.0	7.32	12.3	13.4	6.66	11.1	13.8
5	73.3	73.7	70.6	73.3	64.4	66.9	18.1	20.0	19.8	17.0	19.5	19.8	6.95	12.8	11.8	5.94	13.3	13.8
6	71.1	72.1	68.8	72.1	67.9	67.1	18.1	19.8	20.0	17.5	19.3	19.8	6.75	12.8	13.0	6.90	12.5	13.6
7	74.7	71.9	69.0	72.6	64.2	66.9	18.5	19.3	19.9	17.0	19.3	21.0	9.05	12.0	13.5	5.09	10.5	13.5
8	72.2	71.6	64.1	72.1	65.3	65.1	18.9	19.8	19.9	17.2	19.5	21.0	8.64	15.5	12.7	6.97	12.3	11.6
9	72.7	71.6	66.0	73.1	68.5	65.3	19.1	19.8	20.0	18.1	19.8	21.0	8.81	15.4	14.2	7.22	13.7	14.3

*Same lowercase letters indicates that the temperatures responses are equal for each extraction method US or MS. ($p < 0.5$)

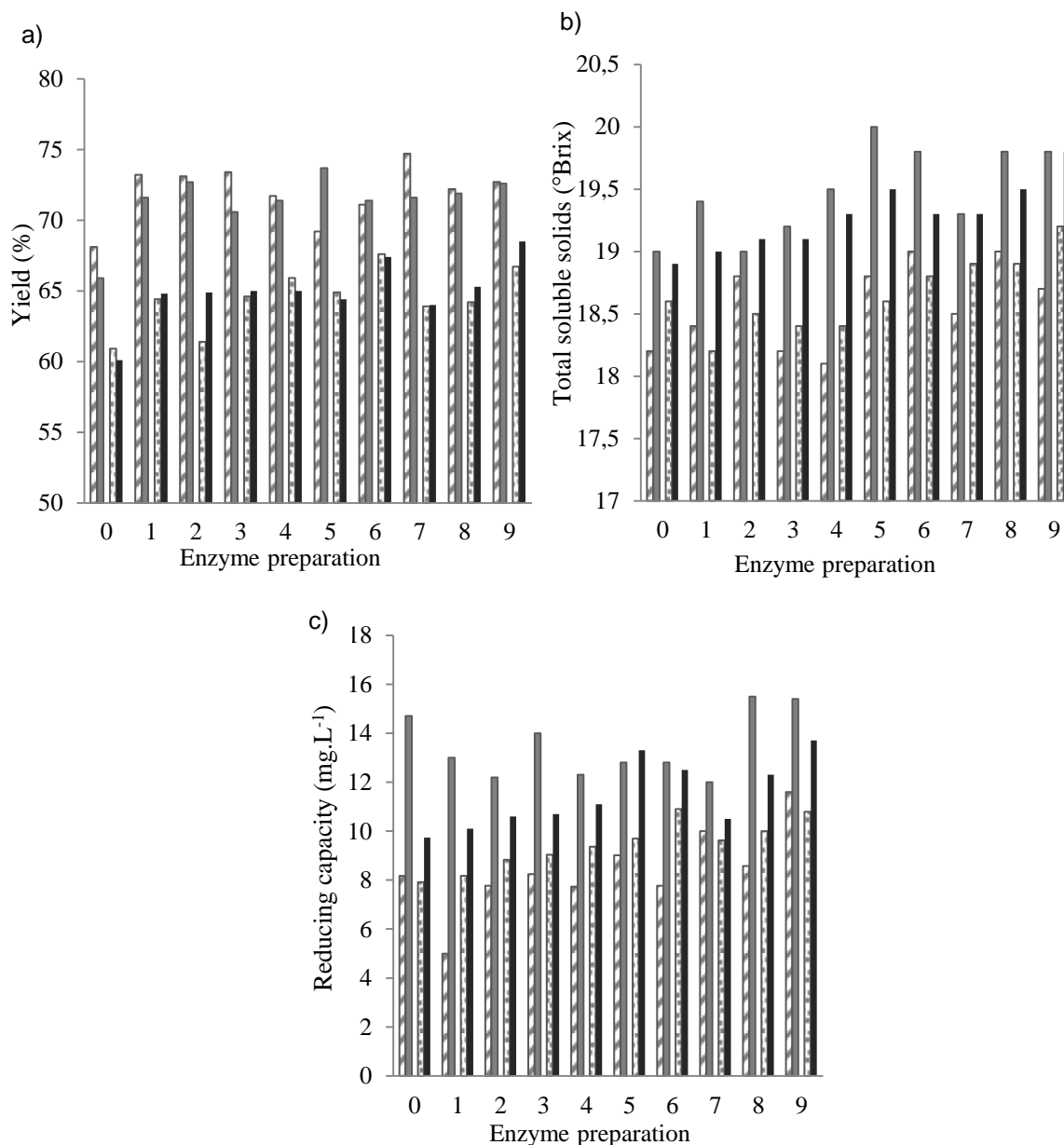


Fig. 1. Extraction yield (a); Total soluble solids (b) and reducing capacity (c) of grape must treated with nine enzyme preparations at different times on US and MS at 50 °C. (▨) 15 min US; (▩) 30 min US; (▤) 15 min MS; (■) 30 min MS.

The EP Pectinex Ultra Clear ® (5), Lallzyme Beta ® (8) and Zimopec PX5 ® (9) presented the best results to GME regarding the previous assays, so, a study of the enzyme concentration was conducted to these preparations on MS, and the results are shown in Fig. 2. The extraction yield (Fig. 2a) increased with the rise of enzyme concentration reaching to the highest value at 1.0 U.g⁻¹ of PE for preparations 9 (79.3 %) and 5 (79.1 %), remaining constant on higher concentrations. Nevertheless, the total soluble solids (Fig. 2b) were not affected by the enzyme concentration, remaining constant, however, Zimopec PX5® presented the highest TSS (20.0 °Brix), and was chosen for the next experiments assays.

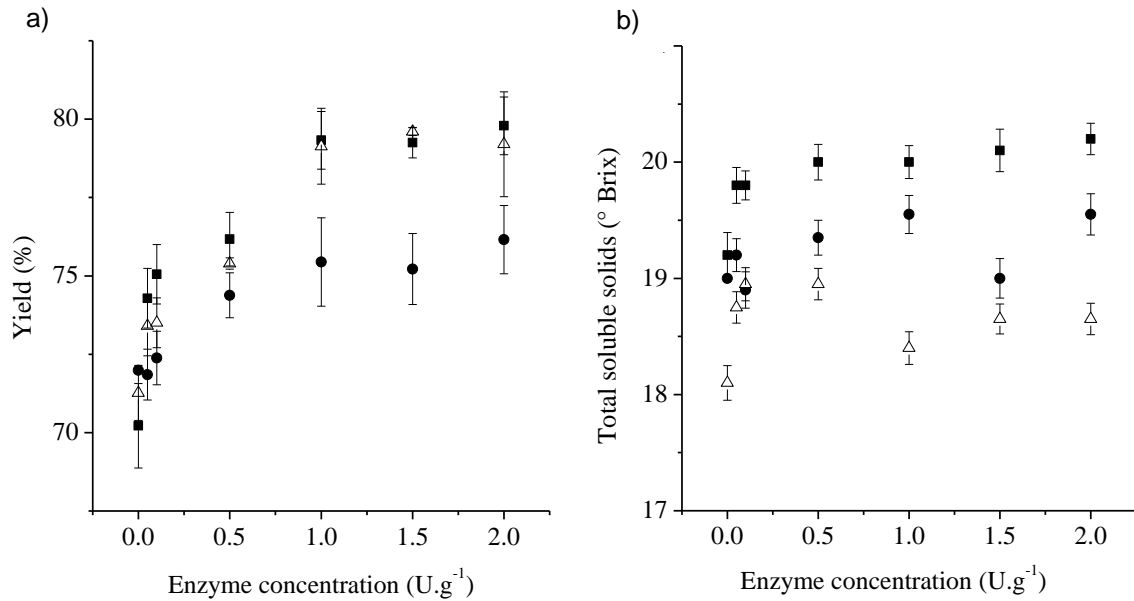


Fig. 2. Extraction yield (a) and total soluble solids (b) of GME on MS with different enzyme concentrations for the enzymatic preparations: (■) Zimopec PX5; (●) Lallzyme Beta; (△) Pectinex Ultra Clear.

3.3 Extraction protocols

3.3.1 Physicochemical analysis and color attributes

Different treatments were carried out in order to verify the effects of each agitation methods and the enzyme activity on Cabernet Sauvignon must extraction. The description of each protocol are presented in Table 1. The physicochemical analysis, antioxidant capacity and color parameters of each treatment were presented in Table 4, 5 and 6 respectively. Ultrasound application improved the grape must extraction when compared to MS, providing higher values for most of the evaluated parameters, highlighting TSS, reducing sugars and reducing capacity, which increased 3.8 %, 19.2 % and 11.7 %, respectively.

The use of US eases phenolic compounds extraction due plant cell wall lysis, maximizing bioactive compounds release.^{13,27,42} US usage on/for apple juice extraction increased phenolic compounds concentration and improved antioxidant capacity, as observed by Abid et al.²⁶

Table 4: Physicochemical analysis of grape must extracted with mechanical stirring (MS) and ultrasound (US) via different extraction methods.

Extraction method	pH	TSS (° Brix)	Yield (%)	Total acidity (g.L ⁻¹)	Reducing sugars (g.L ⁻¹)
MS - 0	3.66 ± 0.02 ^a	18.0 ± 0.0 ^c	71.7 ± 0.5 ^d	0.90 ± 0.05 ^b	219.2 ± 0.8 ^e
MS - E	3.59 ± 0.00 ^{bc}	18.7 ± 0.1 ^a	75.3 ± 0.3 ^b	0.97 ± 0.00 ^{ab}	262.6 ± 0.4 ^{ab}
US - 0	3.62 ± 0.02 ^{ab}	18.8 ± 0.0 ^a	72.3 ± 0.5 ^{cd}	0.94 ± 0.03 ^b	261.3 ± 0.8 ^b
US - E	3.58 ± 0.01 ^{bc}	18.8 ± 0.0 ^a	74.4 ± 0.5 ^{bc}	1.22 ± 0.06 ^a	262.8 ± 0.7 ^{ab}
USMS - 0	3.61 ± 0.02 ^b	17.8 ± 0.0 ^d	74.2 ± 0.2 ^{bc}	0.88 ± 0.01 ^b	220.3 ± 0.8 ^e
USMS - E	3.54 ± 0.02 ^c	18.1 ± 0.1 ^c	75.8 ± 0.4 ^{ab}	0.92 ± 0.02 ^b	263.4 ± 0.6 ^a
MSUS - 0	3.57 ± 0.01 ^{bc}	18.2 ± 0.0 ^c	73.6 ± 0.5 ^c	0.96 ± 0.04 ^{ab}	257.6 ± 0.8 ^c
MSUS - E	3.55 ± 0.01 ^c	18.4 ± 0.0 ^b	76.8 ± 0.4 ^a	1.13 ± 0.02 ^a	261.3 ± 0.8 ^b

*Same lowercase letters indicate that the extraction methods are equal for each response. ($p < 0.5$)

Enzymatic treatment improved the physicochemical parameters for both agitation methods, especially at the MS, where TSS, yield, sugar content and antioxidant activity increased 3.8 %, 5.0 %, 19.8 % and 11.9 %, respectively. Under US treatment (US-E) only antioxidant activity was statistically different over the control (US - 0), enhancing 6.7 % and 9.5 %, respectively. Moreover, all studied parameters were improved by US-E when compared to extraction at mechanical stirring without enzyme (MS - 0). The main differences between those techniques were the enhancement of antioxidant capacity (21.2 %) and reducing sugar (19.9 %) for grape must treated using ultrasound and enzyme (US - E). Furthermore, some authors observed an enhancement on fruit extract composition by simultaneous treatment using enzymes and ultrasound.^{27,43} Tiwari et al.⁴⁴ , obtained a significant improvement of anthocyanin content on grape juice sonicated, while no differences were found on pH, titratable acidity and TSS.

As a final point, the combination of both agitation methods was tested. The experiments were carried out for 15 min in one method, and the remaining 15 min in the other. Both combinations were analyzed: mechanical stirring/ultrasound; ultrasound/mechanical stirring. When MS was employed first (MSUS - 0), TSS and reducing sugars were improved. On the other hand, when US was used first (USMS - 0), an enhancement of reducing capacity (10.7 %) and antioxidant activity (19.6 %), was achieved. The same behavior was observed when enzyme was added.

Table 5: Analysis of antioxidant capacity for grape must extracted with mechanical stirring (MS) and ultrasound (US) techniques.

Extraction method	Reducing capacity (mg.L ⁻¹)	Antioxidant activity (mM)
MS - 0	9843 ± 361 ^c	544.4 ± 4.10 ^c
MS - E	10582 ± 152 ^{bc}	609.1 ± 6.13 ^{ab}
US - 0	11001 ± 227 ^b	567.9 ± 5.15 ^c
US - E	11933 ± 290 ^{ab}	621.8 ± 3.21 ^a
USMS - 0	10532 ± 499 ^{bc}	586.2 ± 4.14 ^b
USMS - E	12792 ± 598 ^a	617.9 ± 2.55 ^{ab}
MSUS - 0	9511 ± 313 ^c	515.0 ± 3.87 ^d
MSUS - E	12042 ± 477 ^{ab}	616.3 ± 5.12 ^{ab}

*Same lowercase letters indicate that the extraction methods are equal for each response. ($p < 0.5$)

Almost all parameters were improved with enzyme application when MS was employed first (MSUS - E) comparing to MSUS - 0. However, when US was employed first (USMS - E), a slight difference between the extraction with and without enzyme (USMS - 0) was found. In general, the order of the method application (US or MS) showed no difference on overall extraction results, but the combination of both methods with enzyme, enhanced must yield and quality parameters.

Table 6: Color parameters for grape must extracted with mechanical stirring (MS) and ultrasound (US).

Extraction method	L^*	a^*	b^*	ΔE^*_{ab}
MS - 0	49.75 ± 0.09 ^{ab}	46.12 ± 1.79 ^c	11.92 ± 1.02 ^b	0.00
MS - E	45.75 ± 2.24 ^{bc}	47.75 ± 0.84 ^b	12.27 ± 0.55 ^b	4.33 ± 0.53 ^d
US - 0	50.47 ± 2.20 ^a	47.46 ± 0.30 ^b	12.23 ± 0.16 ^b	1.54 ± 0.16 ^f
US - E	44.31 ± 2.58 ^{bc}	50.68 ± 1.83 ^{ab}	12.91 ± 0.64 ^b	7.17 ± 0.16 ^b
USMS - 0	47.76 ± 3.76 ^b	48.64 ± 0.89 ^b	12.81 ± 0.22 ^b	3.34 ± 0.22 ^e
USMS - E	44.40 ± 0.37 ^{bc}	50.54 ± 0.84 ^a	13.23 ± 0.44 ^{ab}	7.06 ± 0.43 ^b
MSUS - 0	44.99 ± 1.05 ^{bc}	48.60 ± 0.41 ^b	13.75 ± 0.15 ^{ab}	5.67 ± 0.15 ^c
MSUS - E	42.24 ± 1.67 ^c	50.22 ± 0.11 ^{ab}	13.99 ± 0.34 ^a	8.80 ± 0.34 ^a

*Same lowercase letters indicate that the extraction methods are equal for each response. ($p < 0.5$)

L^* lightness, a^* redness/greenness, b^* yellowness/blueness, ΔE^*_{ab} color difference.

The results of color parameters analysis from grape must extraction are shown in Table 6. Brightness (L^*) significantly decreased with enzyme treatment for all the agitation methods, showing an enhancement on color attributes by the enzyme action. The parameters a^* , b^* , and ΔE^*_{ab} increased when US and enzyme treatment were used, despite that, ultrasound was able to enhance the color parameters even

when applied without enzyme. Regarding the color difference (ΔE^*_{ab}), the extraction on MSUS - E presented the highest value (8.8) comparing to the control (MS - 0), indicating a great improvement of color.

3.3.2 Phenolic compounds and anthocyanins

Polyphenols chemical structure enables them to act as antioxidants, scavenging and neutralizing free radicals and collaborating to wine color stabilization.¹ Nevertheless, the extraction of these components depends on grape maturity stage and extraction procedures.^{45,46} Hence, the grape must extracted by different methods was analyzed for phenolic compounds identification via HPLC-DAD-MS and the anthocyanin concentration by HPLC-DAD.

The chromatograms processed at 280, 320, 360 and 520 nm (Online Resource 1) showed the separation of 38 phenolic compounds of Cabernet Sauvignon grape must. The compounds identified by HPLC-DAD-MS were summarized in Online Resource 2 and Online Resource 3. A similar profile of phenolic compounds with different peak intensity was observed to all treatments. The main phenolic compound was identified as Quercetin-hexoside (**peak 23**), which has been reported as the most abundant phenolic compound in grapes.^{6,36,38,46}

Furthermore, at the chromatogram processed at 280 nm, it was observed a **peak (*)** from a non-phenolic compound, presenting molecular ion of m/z 366, identified as 3-indolyl-(2R)-O- β -D-glucosyl-lactic acid, as describe by Fabre et al.³⁷ This compound did not present any effect on the flavor of red wines because of its nonvolatile nature, however, it has been associated to ensure the wine quality contributing to wine astringency taste due to strong structural homology with other compounds.⁴⁷

Anthocyanins are important compounds of grapes berries, responsible for color and antioxidant power. These compounds were separated and identified in the chromatogram processed at 520 nm and are described in Table S2. The highest peaks (**15** and **22**) were identified and are related to a co-elution of different anthocyanins. **Peak 15** was a mixture of peonidin 3-O-hexoside, malvidin 3-O-hexoside and vitisin A-delphinidin-3-hexoside, based on the ion molecular $[M]^+$ at

463, 493 and 533, and mass fragments of MS² at m/z 301, 331 and 371, corresponding to the loss of one hexose, respectively. Moreover, **peak 15** showed MS spectrum and MS² fragmentation patterns similar to data previously reported in the literature.^{35,48} **Peak 22** was identified as a mixture of malvidin 3-O-6-O-acetyl-hexoside and peonidin 3-O-6-O-acetyl-hexoside, based on the ion molecular [M]⁺ at 535 and 505, and mass fragments in MS² at m/z 331 and 301, corresponding to the loss of one acetyl-hexoside (204 Da), respectively.

Table 7: Anthocyanin concentration for grape must extracted with mechanical stirring (MS) and ultrasound (US).

Extraction method	Anthocyanin concentration (mg.L ⁻¹)		
	peak 15	peak 22	Total
MS - 0	30.2 ± 2.19 ^b	13.2 ± 0.52 ^c	43.4 ± 2.71 ^c
MS - E	30.7 ± 1.02 ^b	14.4 ± 0.63 ^c	45.1 ± 1.65 ^{bc}
US - 0	28.4 ± 1.61 ^b	13.9 ± 0.21 ^c	42.3 ± 1.82 ^c
US - E	33.2 ± 1.94 ^b	16.7 ± 0.27 ^b	49.9 ± 2.21 ^{bc}
USMS - 0	30.3 ± 2.56 ^b	16.7 ± 0.53 ^b	47.0 ± 3.09 ^{bc}
USMS - E	39.6 ± 2.66 ^a	19.2 ± 0.17 ^a	58.8 ± 2.83 ^{ab}
MSUS - 0	31.2 ± 0.38 ^b	14.8 ± 0.95 ^c	46.0 ± 1.33 ^{bc}
MSUS - E	42.1 ± 2.36 ^a	19.3 ± 0.79 ^a	61.4 ± 3.15 ^a

*Same lowercase letters indicate that the extraction methods are equal for each response. (p < 0.5)

Peak 15: mixture of peonidin 3-O-hexoside + malvidin 3-O-hexoside + vitisin A-delphinidin-3-hexoside.

Peak 22: mixture of malvidin 3-O-6-O-acetyl-hexoside and peonidin 3-O-6-O-acetyl-hexoside.

Despite of the large amount of phenolic compounds identified, their quantification was not possible due the low area and peak intensity. Nevertheless, their presence has an important role in the stabilization of the wine color, since they participate at the pigmentation reactions with anthocyanins.^{31,49} Therefore, only anthocyanins could be quantified by HPLC-DAD, and the anthocyanin concentration for each treatment is shown in Table 7. All extraction methods showed similar profiles of phenolic compounds, whereas differences on anthocyanin concentration.

The total anthocyanin concentration varied from 42.3 mg.L⁻¹ to 61.4 mg.L⁻¹, and MSUS - E provided an increase of 41.5 % on anthocyanins contents over the control (MS - 0), followed by USMS - E (35.5 %) and US-E treatments (17.5 %). The results showed that the combination of MS, US and ET was more effective than individual application, possibly because the use of MS alone was not enough to

break the grape cell wall and release the phenolic compounds, and the use of US for 30 min could be excessive, promoting the degradation of anthocyanins by the chemical effect. Thus, the combination of 15 min of US plus 15 min of MS improved the results, being the enzyme treatment essential to obtaining higher anthocyanin values. Carrera et al. and González-Caetano et al.^{50,51} also found higher amounts of anthocyanin for extraction combining US and enzyme application.

Data from the analyses of antioxidant capacity (Table 5) revealed a positive correlation between these methods with the total anthocyanin contents and phenolic compounds. This is in agreement with previously studies, which indicates that treatments with richer content of phenolic compounds also have higher antioxidant activities.⁴⁴

4 CONCLUSION

Considering the evaluated parameters, Zimopec PX5® proved to be the best enzymatic preparation for grape must extraction among all studied commercial preparations. Time and temperature of extraction promoted changes on quality components of Cabernet Sauvignon must. Higher temperatures had a positive effect on antioxidant compounds extraction, whereas, lower temperature was not enough for a good extraction of sugar and bioactive compounds. Ultrasound required lower operating temperatures to obtain extracts with similar yield and antioxidant characteristics than those resulted from MS extraction. Our results showed a synergistic effect between ultrasound, mechanical stirring and enzyme treatment on Cabernet Sauvignon must extraction. The simultaneous treatment of grape must by those techniques enhanced the extraction yield and improved the quality of grape must, comparing to individual application showing to be a good alternative to thermomaceration.

ACKNOWLEDGMENTS

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.

Funding: This work was supported by grants from Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq - process 403505/2013-5) and scholarships from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) to LMG Dalagnol and L Dal Magro.

REFERENCES

1. M. De Nisco, M. Manfra, A. Bolognese, A. Sofo, A. Scopa, G. C. Tenore, F. Pagano, C. Milite and M. T. Russo, *Food Chem.*, 2013, **140**, 623-629.
2. J. Lachman, M. Šulc, K. Faitová and V. Pivec, *Int. J. Wine Res.*, 2009, **1**, 101-121.
3. I. M. Toaldo, F. A. Cruz, T. d. L. Alves, J. S. d. Gois, D. L. G. Borges, H. P. Cunha, E. L. d. Silva and M. T. Bordignon-Luiz, *Food Chem.*, 2015, **173**, 527-535.
4. M. Ortega-Heras, S. Pérez-Magariño and M. L. González-Sanjosed, *LWT - Food Sci. Technol.*, 2012, **48**, 1-8.
5. L. Wang and C. L. Weller, *Trends Food Sci. Technol.*, 2006, **17**, 300-312.
6. S. R. Segade, C. Pace, F. Torchio, S. Giacosa, V. Gerbi and L. Rolle, *Food Res. Int.*, 2015, **71**, 50-57.
7. A. B. Bautista-Ortín, A. Martínez-Cutillas, J. M. Ros-García, J. M. López-Roca and E. Gómez-Plaza, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2005, **40**, 867-878.
8. S. Al Bittar, S. Périno-Issartier, O. Dangles and F. Chemat, *Food Chem.*, 2013, **141**, 3268-3272.
9. I. Praporscic, N. Lebovka, E. Vorobiev and M. Mietton-Peuchot, *Sep. Purif. Technol.*, 2007, **52**, 520-526.
10. N. Yang, K. Huang, C. Lyu and J. Wang, *Food Control*, 2016, **61**, 28-38.
11. S. S. Paranjpe, M. Ferruzzi and M. T. Morgan, *LWT - Food Sci. Technol.*, 2012, **48**, 147-155.
12. J. F. G. Martín and D.-W. Sun, *Trends Food Sci. Technol.*, 2013, **33**, 40-53.
13. F. Chemat, Zill-e-Huma and M. K. Khan, *Ultrason. Sonochem.*, 2011, **18**, 813-835.
14. T. J. Mason, E. Riera, A. Vercet and P. Lopez-Buesa, in *Emerging technologies for food processing*, ed. D.-W. Sun, Elsevier Academic Press, San Diego, USA, 1 edn., 2005, ch. 13, pp. 323-351.
15. H. Feng, G. V. Barbosa-Cánovas and J. Weiss, *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*, Springer, New York, 2011.
16. D. Knorr, A. Froehling, H. Jaeger, K. Reineke, O. Schlueter and K. Schoessler, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 2011, **2**, 203-235.
17. K. Guerrouj, M. Sánchez-Rubio, A. Taboada-Rodríguez, R. M. Cava-Roda and F. Marín-Iniesta, *Food and Bioproducts Processing*, 2016, **99**, 20-28.
18. A. C. Soria and M. Villamiel, *Trends Food Sci. Technol.*, 2010, **21**, 323-331.

19. N. Abdullah and N. L. Chin, *Agric. Agric. Sci. Procedia*, 2014, **2**, 320-327.
20. T. J. Mason, A. J. Cobley, J. E. Graves and D. Morgan, *Ultrason. Sonochem.*, 2011, **18**, 226-230.
21. O. E. Szabó and E. Csiszár, *Carbohydr. Polym.*, 2013, **98**, 1483-1489.
22. S. R. Shirsath, S. H. Sonawane and P. R. Gogate, *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, 2012, **53**, 10-23.
23. R. Mawson, M. Gamage, N. Terefe and K. Knoerzer, in *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*, eds. H. Feng, G. Barbosa-Canovas and J. Weiss, Springer New York, 2011, DOI: 10.1007/978-1-4419-7472-3_14, ch. 14, pp. 369-404.
24. F. Chemat, N. Rombaut, A.-G. Sicaire, A. Meullemiestre, A.-S. Fabiano-Tixier and M. Abert-Vian, *Ultrason. Sonochem.*, 2017, **34**, 540-560.
25. L. N. Lieu and V. V. M. Le, *Ultrason. Sonochem.*, 2010, **17**, 273-279.
26. M. Abid, S. Jabbar, T. Wu, M. M. Hashim, B. Hu, S. Lei, X. Zhang and X. Zeng, *Ultrason. Sonochem.*, 2013, **20**, 1182-1187.
27. W. Tchabo, Y. Ma, F. N. Engmann and H. Zhang, *Ind. Crops Prod.*, 2015, **63**, 214-225.
28. 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.
29. M. J. Bailey, P. Biely and K. Poutanen, *J. Biotechnol.*, 1992, **23**, 257-270.
30. G. L. Miller, *Anal. Chem.*, 1959, **31**, 426-428.
31. V. L. Singleton and P. Esau, *Adv. Food Res. Suppl.*, 1969, **1**, 1-261.
32. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans, *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, **26**, 1231-1237.
33. E. Rodrigues, L. R. B. Mariutti and A. Z. Mercadante, *J. Agric. Food Chem.*, 2013, **61**, 3022-3029.
34. B. Bai, F. He, L. Yang, F. Chen, M. J. Reeves and J. Li, *Food Chem.*, 2013, **141**, 3984-3992.
35. L. Dal Magro, L. M. G. Dalagnol, V. Manfroi, P. F. Hertz, M. P. Klein and R. C. Rodrigues, *LWT - Food Sci. Technol.*, 2016.
36. R. Flamini and P. Traldi, *Mass spectrometry in grape and wine chemistry*, John Wiley & Sons, Hoboken, USA, 2009.
37. S. Fabre, C. Absalon, N. Pinaud, C. Venencie, P.-L. Teissedre, E. Fouquet and I. Pianet, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 1201-1208.

38. A. Vallverdú-Queralt, N. Boix, E. Piqué, J. Gómez-Catalan, A. Medina-Remon, G. Sasot, M. Mercader-Martí, J. M. Llobet and R. M. Lamuela-Raventos, *Food Chem.*, 2015, **181**, 146-151.
39. S. G. Cabrera, J. H. Jang, S. T. Kim, Y. R. Lee, H. J. Lee, H. S. Chung and K. D. Moon, *J. Food Process. Preserv.*, 2009, **33**, 347-360.
40. M. d. S. Lima, I. d. S. V. Silani, I. M. Toaldo, L. C. Corrêa, A. C. T. Biasoto, G. E. Pereira, M. T. Bordignon-Luiz and J. L. Ninow, *Food Chem.*, 2014, **161**, 94-103.
41. D. S. Ribeiro, S. Henrique, L. S. Oliveira, G. A. Macedo and L. F. Fleuri, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2010, **45**, 635-641.
42. N. M'hiri, I. Ioannou, N. Mihoubi Boudhrioua and M. Ghoul, *Food and Bioproducts Processing*, 2015, **96**, 161-170.
43. B. Dang, T. Huynh and V. Le, *Int. Food. Res. J.*, 2012, **19**, 509-513.
44. B. K. Tiwari, A. Patras, N. Brunton, P. J. Cullen and C. P. O'Donnell, *Ultrason. Sonochem.*, 2010, **17**, 598-604.
45. D. Villano, M. S. Fernández-Pachón, A. M. Troncoso and M. C. García-Parrilla, *Food Chem.*, 2006, **95**, 394-404.
46. E. S. Vázquez, S. R. Segade and I. O. Fernández, *Eur. Food Res. Technol.*, 2010, **231**, 789-802.
47. O. Cala, E. J. Dufourc, E. Fouquet, C. Manigand, M. Laguerre and I. Pianet, *Langmuir*, 2012, **28**, 17410-17418.
48. M. Stefova and V. Ivanova, in *Fruit and cereal bioactives: sources, chemistry, and applications*, eds. Ö. Tokuşoğlu and C. A. Hall III, CRC Press, Boca Raton, USA, 2011, ch. 20, pp. 409-427.
49. Z. Liang, B. Wu, P. Fan, C. Yang, W. Duan, X. Zheng, C. Liu and S. Li, *Food Chem.*, 2008, **111**, 837-844.
50. C. Carrera, A. Ruiz-Rodríguez, M. Palma and C. G. Barroso, *Anal. Chim. Acta*, 2012, **732**, 100-104.
51. M. González-Centeno, F. Comas-Serra, A. Femenia, C. Rosselló and S. Simal, *Ultrason. Sonochem.*, 2015, **22**, 506-514.
52. A. Golmohamadi, G. Möller, J. Powers and C. Nindo, *Ultrason. Sonochem.*, 2013, **20**, 1316-1323.

CAPÍTULO IV

5 ARTIGO II

Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters

Este trabalho avaliou a influência do ultrassom na eficiência catalítica das enzimas pectinase, xilanase e celulase. Estudos sobre a atividade enzimática foram realizados em diferentes valores de pH, e com soluções de enzima e substrato previamente tratadas por ultrassom. Os parâmetros cinéticos e termodinâmicos também foram determinados para melhor compreender os efeitos do ultrassom na atividade enzimática. Os resultados estão apresentados no manuscrito a seguir, que foi submetido para publicação na revista *Ultrasonics Sonochemistry*.

Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters

Luíza M. G. Dalagnol¹, Vitória C. C. Silveira¹, Halisson Baron¹, Vitor Manfro², Rafael C. Rodrigues^{1,*}

¹ 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.

² Beverages Technology Lab, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul.

* Corresponding author:

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

HIGHLIGHTS

- Ultrasound influence was investigated on pectinase, xylanase and cellulase activities.
- Substrates sonication improved xylanase and cellulase activities under ultrasound.
- Ultrasound increased the rate constant and the catalytic efficiency for all enzymes.
- Ultrasound was more effective at low temperatures for pectinase.
- Ultrasound was more effective at high temperatures for xylanase and cellulase.

ABSTRACT

The ultrasound effects were investigated on different parameters of pectinase (PE), xylanase (XLN) and cellulase (CE). The activity of these enzymes was evaluated at different pH and temperatures, and enzymes kinetics and thermodynamic parameters were determined comparing ultrasound (US) and mechanical stirring (MS). In general, ultrasound increased the activity of the enzymes, 5 % for PE, 30 % for XLN and 25 % for CE. Also, ultrasound allowed higher activity at the extremes of the tested pH range (pH 3 and 7), mainly for XLN and CE. Substrates and enzymes solutions were sonicated before enzyme activity, and the previous sonication of xylan for 30 min increased the enzyme activity in almost 30 % under US and almost 20 % under MS. On the other hand, previous sonication of cellulase increased the activity in 50 % under US and 40 % under MS. For the three enzymes, the catalytic efficiency was higher under US than MS (24.5 % for PE, 16.4 % for XLN and 17.5 % for CE). Ultrasound affected the PE activity at low temperature, while its effect was more representative at high temperatures for XLN and CE activities. Our results demonstrated that ultrasound can affect enzymes and substrates, making it a powerful tool for enzymatic-catalyzed reactions.

Keywords: Enzyme activity; Ultrasound; Thermodynamics; Kinetics.

1 INTRODUCTION

Ultrasound (US) is an emerging technology defined as sound waves with vibrational energy at frequencies that exceeds the hearing limit of the human ear (20 - 100 kHz) [1,2]. It is considered a “green” technology due its ecofriendly properties with high efficiency, and have been frequently used in several fields, including food industry, promoting a high reproducibility of the process, reducing on the processing costs and improvement on selective extraction, mass transfer, freezing, cutting, drying, bleaching and sterilization process [3–7].

The main effects of US in a liquid medium are attributed to the physical and chemical phenomena, which can be generally summarized as the implode collapse of gas micro bubbles dissolved in the liquid, known as cavitation, and the free radical formation [8,9]. Cavitation can cause alterations in the molecular structure of the cells, improving mass transfer, minimizing the processing time, enhancing the quality and ensuring safety of food products by protein and pathogens denaturation [7,10,11]. These phenomena may cause alterations in enzymes functionality, since some of them act in an aqueous medium [12,13].

US effects on enzyme structure and activity have been the subject of some researches. US has been used as a method for enzyme inactivation [12,14–16], however, some studies have shown that US may activate and improve enzyme activity [13,17,18]. Sonication effects may change the biocatalyst mainly through three mechanisms: thermal effect, raising the temperature due to cavitation; free radical formation, generated by sonication of water molecules, such as $\bullet\text{OH}$ and $\text{H}\bullet$; and molecular alterations, caused by the mechanical and shear forces from cavitation, resulting in microstreaming and bubbles collapse [9,13,15,19].

However, the interference of these effects are strongly dependent of US intensity and duration [20]. Low-intensity US helps to disintegrate the enzyme molecular aggregates into smaller fragments, exposing more active sites and contributing to an increase on enzymes activity [15,21,22]. Meanwhile, high-intensity US, combined with high temperature and time, can inactivate the enzymes, exposing them to extreme conditions and leading to degradation by hydrogen peroxide and other free radicals reactions [12,16].

In this sense, it is important to know the effects of the ultrasound in the enzyme activity. Although some effects are known for certain enzymes, it can be different for others due to differences in the amino acid sequence and enzyme structure. Thus, in this work we studied the impact of ultrasound treatment on different parameters of pectinase (PE), xylanase (XLN) and cellulase (CE) activities. These enzymes are responsible for the degradation of structural polymers of plant cell walls, as: pectin, a class of complex colloidal acid polysaccharides, predominantly consisted of 1,4-linked α -D-galacturonic acid residues; xylan, a hemicellulosic polysaccharide containing a backbone of xylose residues linked by β -1,4-glycosidic bonds; and cellulose, a homopolymer of β -(1,4)-linked cellobiose residues [23–25]. These enzymes are widely used on textile and paper industries, but especially on the food sector, in juice, wine and animal feed industries [25–29]. The activity of these three enzymes under sonication was evaluated at different pH and temperature. The effects of ultrasound on the enzyme and substrates solutions are measured incubating both solutions to sonication before the enzymatic reaction. Additionally, the kinetic and thermodynamic parameters for each enzyme, with or without ultrasound treatment, were also determined.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Chemicals

The enzyme preparation Zimopec PX5® was obtained from Vêneto Mercantil (Brazil). Galacturonic acid, pectin from apple, and xylan from beechwood were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). All other chemicals were of analytical or HPLC grade.

2.2 Enzymatic activities

For all enzymatic activity described below, the amount of reducing groups released was estimated using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method proposed by Miller [30]. All experiments were performed in triplicate, and the results are presented in terms of mean and standard deviation. Otherwise stated, the temperature and pH for each enzyme activity are described in each method.

2.2.1 *Determination of pectinase activity*

Pectinase (PE) activity was estimated using pectin from apple (1.0 mg mL^{-1}) as substrate at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 1 min, pH 4.8 (citrate buffer, 0.05 M), according to method described by Dal Magro et al [31]. One unit of pectinase was defined as the amount of enzyme required to produce $1 \text{ } \mu\text{mol}$ of galacturonic acid per minute under reaction conditions.

2.2.2 *Determination of xylanase activity*

Xylanase (XLN) activity was determined following the method proposed by Bailey et al [32] using xylan (10 mg mL^{-1}) as substrate. The reaction was carried out for 5 min at $50 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 5.0 (sodium acetate buffer, 0.05 M). One unit of xylanase was defined as the amount of enzyme required to produce $1 \text{ } \mu\text{mol}$ of xylose per minute under reaction conditions.

2.2.3 *Determination of cellulase activity*

The cellulase (CE) activity was measured using Whatman n° 1 filter paper (50 mg mL^{-1}) as substrate, at $50 \text{ }^\circ\text{C}$ for 5 min, pH 4.8 (citrate buffer, 0.05 M), according to described by Dal Magro et al [31]. One unit of cellulase was defined as the amount of enzyme required to produce $1 \text{ } \mu\text{mol}$ of glucose per minute under reaction conditions.

2.3 Equipment

The equipment used in all experiments was an ultrasonic bath (US) (Unique Inc., model USC 2800A, Brazil), with temperature control and 9.5 L of working volume presenting these dimensions: 300 x 240 x 150 mm (length x width x height). Two disc transducers were placed at the bottom of the reactor. The ultrasonic frequency was 40 kHz and the total ultrasonic power 220 W.

A shaking thermostatic water bath (MS), (MA-093, Marconi, Piracicaba, Brazil) was used for the assays as control method.

2.4 Effect of pH on enzymes activities under US

The enzymes activities were measured varying the pH from 3 to 7 (acetate or citrate buffer (0.05 M) for pH from 3 to 5, and phosphate buffer (0.05 M) for pH from 6 to 7) and the enzymatic reactions were conducted as described in section 2.2, under US or MS. The results were reported as relative activity considering the maximum enzyme activity in each experimental group as 100 %, and the average and the standard deviation of three assays.

2.5 Effect of sonication on enzyme and substrate solution

In order to verify the effect of sonication on enzymatic activities, the enzyme and substrates solutions were sonicated individually for different times (0, 1, 5, 10, 15 and 30 min) and then used to measure the enzyme activity.

Firstly, the enzyme solution (in 0.05 M sodium citrate buffer, pH 4.8) was sonicated for 1, 5, 10, 15 and 30 min, then an aliquot was taken and the enzyme activity was measured under US or MS. In the same way, substrate solution was also sonicated for 1, 5, 10, 15 and 30 min. The enzymes activities were measured on US and MS. All experiments were conducted in triplicate considering the average and the standard deviation, and the results are presented in terms of relative activity.

2.6 Enzymatic Kinetics

Different concentrations of substrate (pectin, 0.1 – 10 mg mL⁻¹; filter paper, 2.5 – 100 mg mL⁻¹; and xylan, 1 – 25 mg mL⁻¹) were employed to determine the kinetics parameters. All the assays were conducted based on the description of section 2.2 under US or MS.

The reaction rates for the three enzymes at different substrate concentrations were measured and the values of the Michaelis–Menten constant (K_m) and maximum reaction rate (V_{max}) were calculated fitting the initial reaction rates (v) for each substrate concentration (S) to the Michaelis–Menten equation:

$$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

The V_{max} and K_m values were estimated by nonlinear regression using Levenberg-Marquardt algorithm in the Statistica 12 (StatSoft, Inc.) software. The catalytic efficiency was calculated as V_{max}/K_m .

2.7 Thermodynamic parameters

The activation energy (E_a) for each enzyme was determined at the range of temperature from 30 to 60 °C. E_a was calculated from the slope of a linear plot of $\ln(k)$ of rate constant per minutes against the inverse of temperature $1/T$ (K^{-1}), according to Arrhenius equation:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (2)$$

where, A is the pre-exponential factor, T is the absolute temperature (K), and R is the universal gas constant ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$). k was expressed in min^{-1} , and the activation energy in kJ mol^{-1} .

The thermodynamic parameters Gibbs free energy (ΔG), enthalpy (ΔH) and entropy (ΔS), were calculated using the Eyring's transition state theory from a plot of $\ln k/T$ against $1/T$.

$$k = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right) = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}\right) \quad (3)$$

where, T is the absolute temperature (K), k_B is the Boltzman constant ($1.38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) and h is the Planck constant ($6.6256 \times 10^{-34} \text{ J s}^{-1}$). The (ΔH) was calculated using the activation energie as shown in Eq. (4), ΔG was calculated using Eq. (3), and ΔS was calculated using the enthalpy and free energies of activation, as represented in Eq. (5).

$$\Delta H = E_a - RT \quad (4)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (5)$$

2.8 Statistical analysis

The experimental data were analyzed with the ANOVA and Tukey test with significant level of 0.05 using the software Statistica 12 (StatSoft, Inc.).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Effect of pH on enzymes activity under sonication

The pH affects the catalytic efficiency of the enzymes. Extreme pH values may change the protein structure, leading to a partial or irreversible denaturation, resulting in a loss of activity. The effects of pH on pectinase (PE), xylanase (XLN) and cellulase (CE) activities were determined by measuring the enzyme activity at pH values from 3.0 to 7.0 under ultrasound (US) or on the stirring bath (MS). The results are reported on Fig. 1 in terms of relative activity.

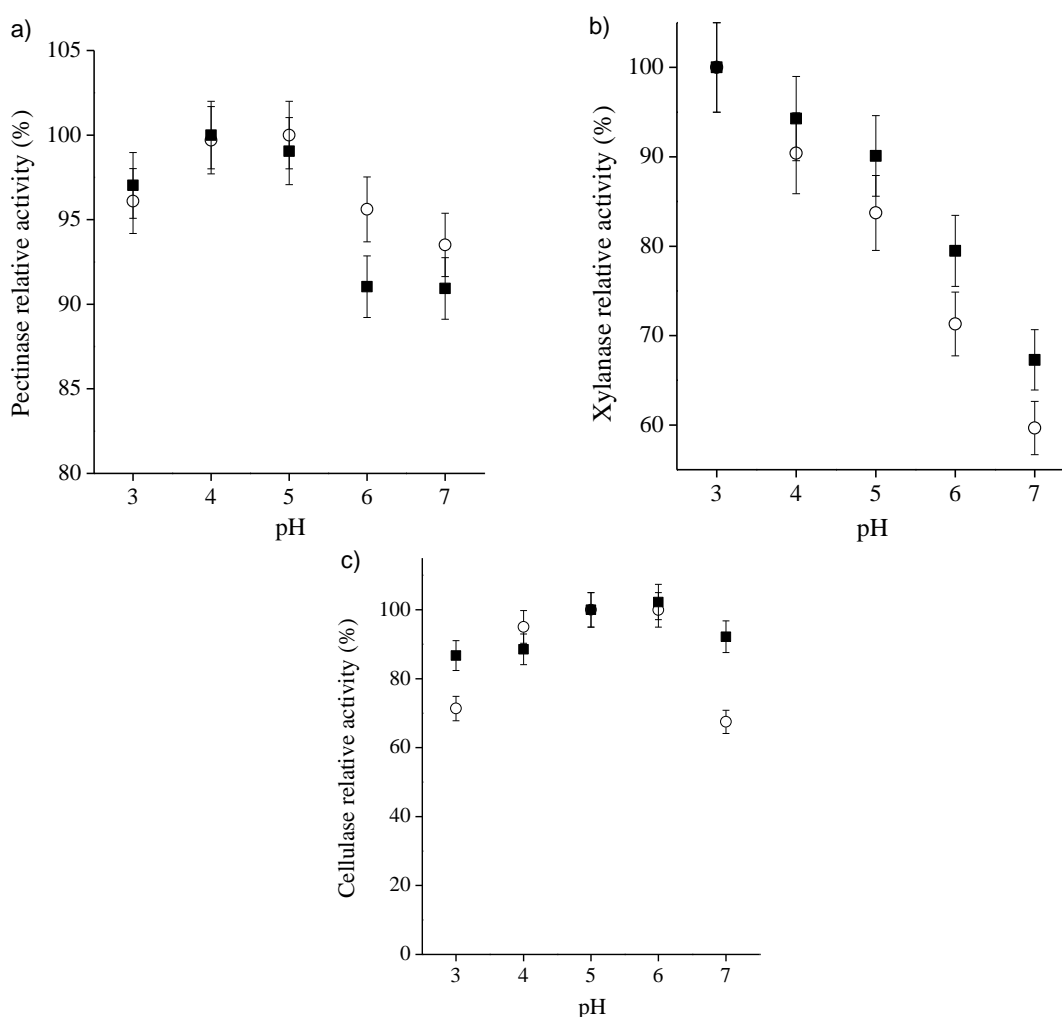


Fig 1 – Evaluation of (a) pectinase, (b) xylanase and (c) cellulase activity with different pH values at (■) ultrasound or (○) stirring bath.

Pectinase presented a similar profile on enzymatic activity performance on US and MS (Fig. 1a). The higher PE activity was obtained at pH 4 and 5, and are in agreement with previous studies [33]. However, the increase on pH decreased the

PE activity in 7 % on MS and 10 % on US. For all pHs evaluated, the absolute activity under US was higher than MS, showing that even with a possible large enzyme inactivation by US, sonication may enhance the enzyme activity on adverse pHs. Enzymatic activity on US was 8896; 9169 and 8337 U g⁻¹ to pH 3; 4 and 7, respectively, while on MS, it was 8340; 8653 and 8116 U g⁻¹, respectively. At extreme conditions, US enhance the cavitation effects in the liquid medium, causing great damage to polypeptide chains, and generation of free radicals, that react with the enzyme, causing enzyme inactivation [15].

Xylanase presented a similar behavior between US and MS responses (Fig. 1b). At lower pH, the enzyme activity was higher for both agitation methods, and decreased as pH increased. XLN activity was, in average, 30 % higher on US than on MS, on the adverse pHs. Enzymatic activity on US was 5192 and 4285 U g⁻¹ to pH 3 and 7, respectively, while on MS, it was 4285 and 2556 U g⁻¹, respectively. The decrease of the activity at high pH was lower under sonication, showing that the enzyme activity may be enhanced by US. Furthermore, sonication also enhanced the CE activity, especially on the extremes pH, as can be seen in Fig. 1c. The optimum pH was between 5 and 6 for both assays. At the same range of pH, the loss of activity was considerably lower on the sonicated reaction, decreasing only 10 % on the extremes pH values (3 and 7) on US, while on MS the enzyme activity decreased around 30 %. Enzymatic activity on US was 1081; 1275 and 1150 U g⁻¹ to pH 3; 6 and 7, respectively, while on MS, it was 786; 1102 and 743 U g⁻¹, respectively.

Slight changes in the environmental conditions, including shear stress, pH and ionic strength, might readily denature enzymes, mostly when combined with the physical and chemical effects of cavitation [12]. Moreover, ultrasound proved to be able to alter the enzyme response to pH changes [34], acting as protective agent for CE and XLN, or contributing to enzyme inactivation for PE, for example. However, the reaction performance on US obtained the highest results considering the absolute enzyme activities, increasing PE, XLN and CE activities in 5.6, 21.2 and 15.7 %, respectively.

3.2 Effects of sonication on enzyme and substrate solution

The enzyme and substrates (pectin, xylan and filter paper) solutions diluted in a sodium citrate buffer were sonicated in the ultrasonic bath for different times (0, 1, 5, 10, 15 and 30 min) to enzymatic activity of PE, XLN and CE evaluation on US and MS. The results are shown in Fig. 2.

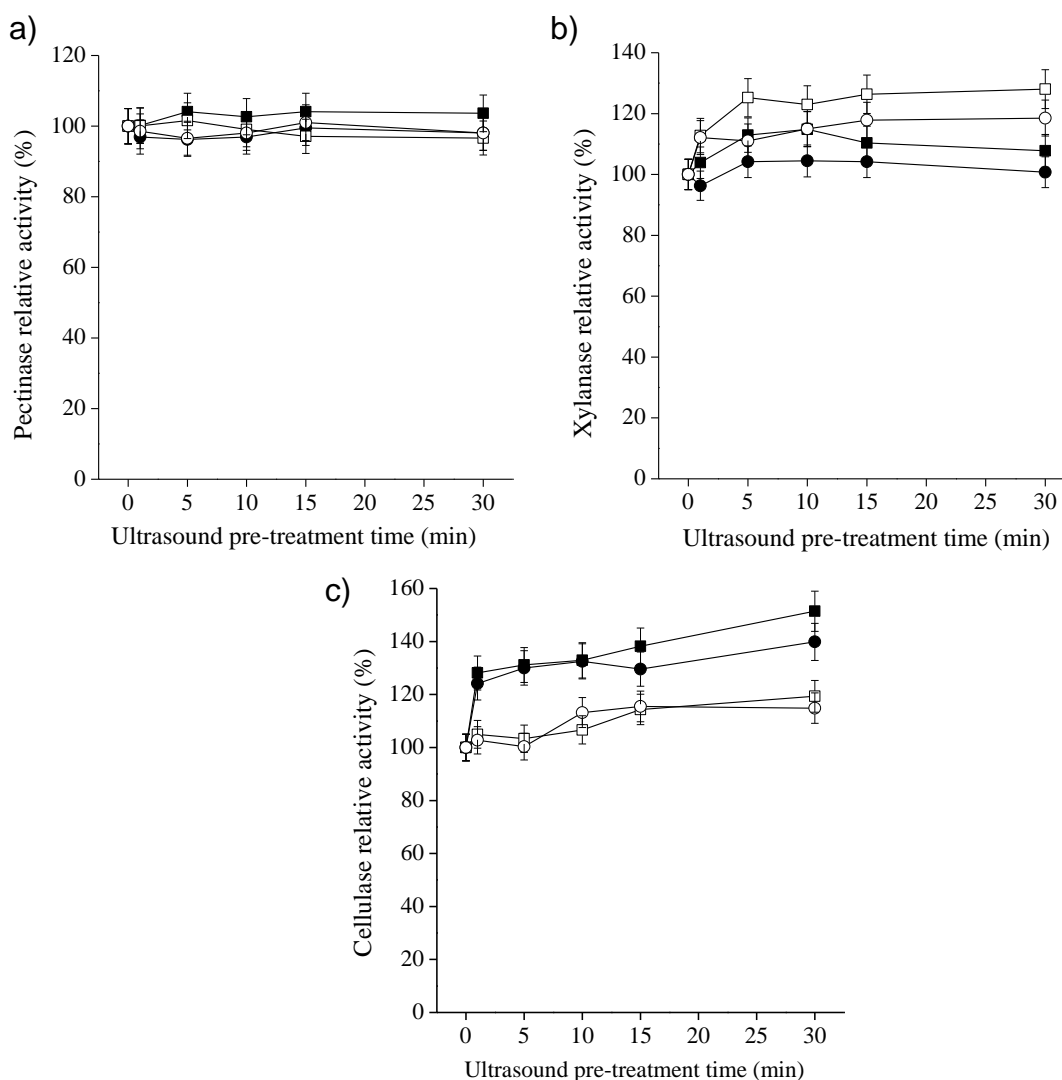


Fig 2 – Evaluation of (a) pectinase (37 °C; pH 4.8), (b) xylanase (50 °C; pH 5) and (c) cellulase (50 °C; pH 4.8) activity combining the pre-sonication of enzyme and/or substrate. (■) Enzyme solution pre-sonicated - activity measured on US; (●) Enzyme solution pre-sonicated - activity measured on MS; (□) Substrate solution pre-sonicated - activity measured on US; (○) Substrate solution pre-sonicated - activity measured on MS.

In general, pectinase activity (Fig. 2a) was not affected by the enzyme or substrate sonication, presenting small differences between the treatments and relative activities around 100 %. The application of ultrasound on pectin solution could help in the de-esterification process of pectin chain [35], which facilitates the

activity of some pectinases such as polygalacturonase that cleaves the glycosidic linkages next to the free carboxyl groups from pectin chain [36]. Ma et al (2016) stated that the combination of US and PE promoted a more complete degradation of pectin, by the cooperation between US de-esterification and pectinase activity. This phenomenon may explain the same behavior on pectinase activity by previous sonication of enzyme or substrate, showing that the combination of PE and US is already enough for a complete degradation of pectin. Nevertheless, when enzyme solution was sonicated and the reaction was carried out on the ultrasonic bath, a slight increase was observed. The enzymatic activity of PE pre-sonicated by 30 min measured on US was 3084 U g^{-1} , while the activity of substrate pre-sonicated by 30 min measured on US was 2845 U g^{-1} , showing that US may help to activate the enzyme structure, enhancing the absolute enzyme activity.

In contrast, xylanase activity (Fig. 2b) presented great differences through the sonication treatment, with higher results for the substrate sonicated, especially when the reaction was carried out on the ultrasonic bath. The maximum increase on XLN activity (25 % compared to control) was obtained with 5 min of substrate pre-sonication, remained constant after this time. Moreover, the activity under US was also higher when enzyme solution was submitted to the ultrasonic treatment, in spite of, XLN activity remained unchanged to reaction carried out on MS, indicating that US improved the hydrolysis. Xylan is a complex polysaccharide consisting in a backbone of xylose residues linked by α -1,4-glycosidic bonds, and for a complete breakdown, a of complex of several hydrolytic enzymes with diverse specificity and modes of action are required [23]. Sonication may alter the xylan chains easing the access of the xylanolytic enzymes to substrate. It is important to remark the effects of ultrasound on the substrate. Even when the enzyme activity was carried out at MS, the previous sonication of xylan improved the enzyme activity.

Cellulase activity (Fig. 2c) showed a similar behavior as xylanase. The sonication of the substrate also enhanced the enzyme activity, reaching to 17 % for both methods (US and MS) at 10 min of sonication, without significant difference. Likewise, when enzyme solution was sonicated an enhancement of approximately 40 % and 50 % on enzyme activity was obtained to the samples treated by 30 min and reaction conducted on MS and US, respectively. Moreover, 1 min of enzyme

sonication seems to be enough to enhance CE activity in almost 30 %. Previous studies investigated the alterations on cellulase structure produced by US [22,37–39]. The ultrasonic pretreatment can induce a molecular unfold of protein chain; destroy the hydrophobic interactions of protein molecules, resulting in more hydrophobic groups and inside regions exposed to the outside; and provoke conformational arrangement changes. These changes promoted to cellulase a more uniformity and flexibility, enhancing than the accessibility of substrate and improving the enzyme activity [37].

Sonication of enzyme solution had a positive effect mainly to cellulase activity measured on the ultrasonic bath. The increase of catalytic activity are related to the enzymes molecular structure modified by the US, which could make the enzyme more accessible for hydrolyses reaction, resulting in the increase of activity. On the other hand, enzyme sonication showed a nice effect on xylanase activity, whereas it was highly improved when substrate was sonicated, probably due modifications in xylan chain structure, facilitating the enzyme-substrate binding.

3.3 Effects of sonication on enzymatic kinetics

The catalytic ability of the enzymes is related to the constant of the enzymatic reaction rate. The kinetic curves for PE, CE and XLN performance on US and MS are presented in Fig. 3. The kinetic parameters, maximum reaction rate (V_{max}), Michaelis constant (K_m) and the catalytic efficiency (V_{max}/K_m) are listed in Table 1, and were obtained by nonlinear fitting of the kinetic data to the Michaelis–Menten equation.

Table 1 – Enzymatic kinetic parameters of pectinase, xylanase and cellulase hydrolysis reactions with (US) or without (MS) ultrasound treatment (mean \pm SD).

Enzyme	Treatment	V_{max} (mg mL ⁻¹ min ⁻¹)	K_m (mg mL ⁻¹)	V_{max}/K_m (min ⁻¹)	R^2
Pectinase	US	1513 \pm 7 ^a	1.6 \pm 0.1 ^b	945 \pm 4 ^a	0.9922
	MS	1526 \pm 5 ^a	2.0 \pm 0.1 ^a	759 \pm 2 ^b	0.9931
Xylanase	US	657 \pm 2 ^a	4.5 \pm 0.1 ^a	146 \pm 1 ^a	0.9931
	MS	558 \pm 3 ^b	4.4 \pm 0.1 ^a	125 \pm 5 ^b	0.9821
Cellulase	US	392 \pm 1 ^a	11.3 \pm 0.1 ^a	34 \pm 3 ^a	0.9827
	MS	285 \pm 1 ^b	9.7 \pm 0.1 ^b	29 \pm 1 ^b	0.9873

*Same lowercase letters indicate that each parameter is equal for US and MS. (p < 0.5)

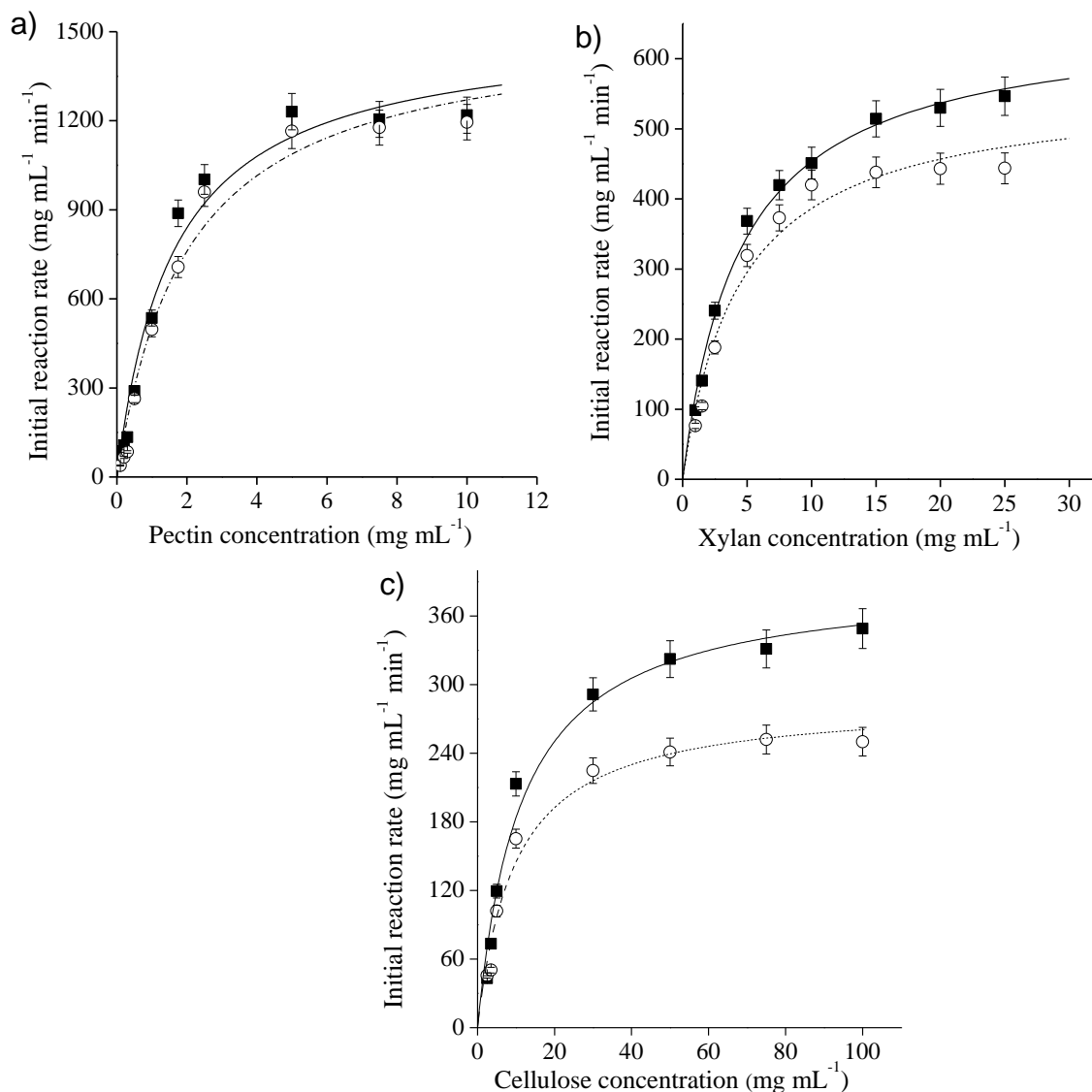


Fig 3 – Michaelis–Menten plots for (a) pectinase, (b) xylanase and (c) cellulase. (■) Enzyme activity on US; (○) Enzyme activity on MS.

Ultrasound decreased the K_m of PE, as presented in Fig 3a and Table 1, proposing a better enzyme-substrate affinity, nevertheless, the V_{max} value was statistically equal for both methods. The catalytic efficiency (V_{max}/K_m) of PE enhanced 24.5 % under sonication condition. This is in agreement with our previous results, which showed that combination of PE and US enhanced the catalytic ability of pectinase, with an effective degradation of pectin. The decrease of K_m indicated an enhancement in the affinity between the pectinase and pectin, possibly by the exposure of more active sites in the pectinase structure under ultrasound [35,40].

For xylanase, K_m was statistically equal for both methods, but sonication increased the V_{max} and the catalytic efficiency (V_{max}/K_m) 15.0 and 16.4 %, respectively.

respectively, as shown in Fig 3b and Table 1. The increase of V_{max} indicates intensification on the binding of xylan–xylanase complex and an accelerated hydrolysis process. As previously observed, when xylan was sonicated a better response on XLN activity was obtained, probably by the enhancement of the xylan residues exposed, which facilitates the access of XLN to the substrate.

V_{max} and catalytic efficiency increased 37.0 and 17.5 %, respectively, on ultrasound treatment compared to reaction on MS, for cellulase activity (Fig. 3c). The evaluation of CE and substrate sonicated conducted previously, confirmed that ultrasound acts on the substrate chain, breaking down the molecular aggregates and modifying the protein chain, making them more readily accessible for enzymatic reaction, enhancing the enzyme activity.

The enhancement on catalytic efficiency for all the enzymes demonstrated that the product formation was processed quickly and efficiently under US treatment. PE activity was improved by sonication, probably caused by structural changes in the enzyme molecule, as suggested by the other assays. Moreover, the enhancement of V_{max} for CE and XLN could be associated to US effects on substrate chains. Moreover, the reaction time for cellulase and xylanase activity assays is 5 min, as presented in Fig. 2, after 5 min of sonication of cellulose or xylan, the enzyme activity was enhanced, which is confirmed by the higher V_{max} for both enzymes on US.

3.4 Effects of ultrasound on the thermodynamic parameters

Arrhenius plots of $\ln(k)$ versus $1/T$ (K^{-1}) for reactions on MS and US are shown in Fig. 4, and the determination coefficients were 0.9817 and 0.9923, 0.9813 and 0.9925, and 0.9766 and 0.9859 for PE, CE and XLN, respectively. These slopes were used to calculate the activation energy (E_a), which determines the sensitivity of the reaction rate to the incubation temperature.

The E_a for PE under US decreased 22.6 % compared with the MS reaction, while XLN and CE presented a higher E_a under sonication, even though their activities were improved on US by the increase of temperature. A lower value of E_a usually indicates a faster change of chemical reaction rate with temperature, showing

that US increased the PE reaction rate, and contributed to a faster enzymatic reaction.

The E_a for CE and XLN reaction on US were higher than those on MS, as can be observed comparing the E_a values of US and MS reaction in Table 2, with the respective activities in Fig. 4. The differences between the lowest and highest temperatures were larger on US reaction than on MS, indicating that CE and XLN activity was more affected by temperature on ultrasound bath, which led to a higher E_a under sonication.

The thermodynamic parameters, Gibbs free energy (ΔG), enthalpy (ΔH) and entropy (ΔS) were calculated and presented in Table 2. Gibbs free energy, which measures the spontaneity of a reaction, was lower for PE, CE and XLN reaction performance on US, than to the untreated reaction. This suggested that the enzyme activity increased, and the enzyme became more available for the hydrolysis process under sonication. The lower ΔG means that the conversions of substrate into product were more feasible [41].

Table 2 – Thermodynamics parameters for pectinase, xylanase and cellulase hydrolysis reactions with (US) or without (MS) ultrasound treatment (mean \pm SD).

Enzyme	Treatment	E_a (kJ mol ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
Pectinase	US	13.0 \pm 0.3 ^a	90.6 \pm 0.1 ^a	10.5 \pm 0.4 ^b	-253.2 \pm 1.0 ^a
	MS	13.8 \pm 0.4 ^a	90.6 \pm 0.0 ^a	11.1 \pm 0.4 ^a	-251.2 \pm 1.8 ^b
Xylanase	US	25.8 \pm 0.3 ^a	10.2 \pm 0.1 ^a	23.2 \pm 0.5 ^a	-248.8 \pm 1.4 ^b
	MS	18.6 \pm 0.4 ^b	10.1 \pm 0.0 ^a	15.6 \pm 0.4 ^b	-267.5 \pm 1.5 ^a
Cellulase	US	12.6 \pm 0.5 ^a	88.9 \pm 0.0 ^b	9.9 \pm 0.4 ^a	-310.9 \pm 0.9 ^b
	MS	10.8 \pm 0.4 ^b	92.6 \pm 0.1 ^a	8.2 \pm 0.4 ^b	-316.9 \pm 1.1 ^a

*Same lowercase letters indicate that each parameter is equal for US and MS. ($p < 0.5$)

The enthalpy (ΔH), which depends of enzyme structure and the capacity of formation and disruption of chemical bonds [35], was 28.1 % lower for PE under US, suggesting that the ultrasound may modify the enzyme structure, probably by the decomposition of hydrogen bonds. On the other hand, the enthalpy for CE and XLN under sonication increased in comparison with the untreated reaction, probably due the higher differences on enzyme activities under US and MS by the rose of temperature.

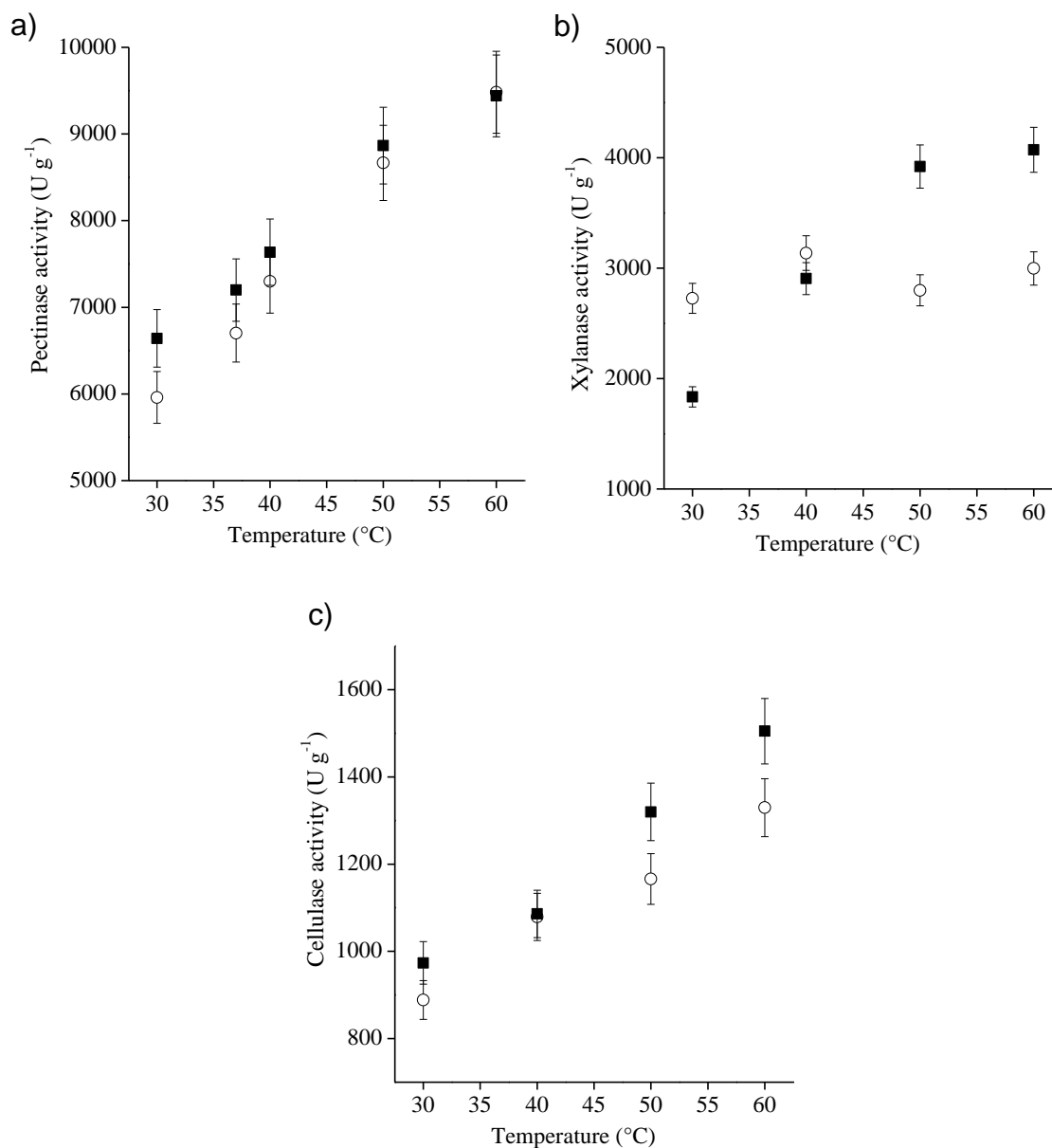


Fig 4 – Effect of temperature on the enzyme activity of (a) pectinase; (b) xylanase and (c) cellulase on (■) ultrasound and (○) stirring bath.

Entropy (ΔS) represents a measure of thermodynamic system disorder and is associated with the number of molecules with sufficient energy to react [34]. Sonication increased the entropy of PE in 6.7 %, suggesting that may occurred a large PE inactivation by US, possibly due free radicals action or conformation modifications [15,42]. Meanwhile, ΔS reduced 3.8 and 31.4 % for CE and XLN under sonication, respectively, indicating that US generated a lower enzyme inactivation for cellulase and xylanase, being beneficial to the hydrolysis process.

PE activity was favored mainly at low temperatures, as observed by Ma (2015) [17], which obtained a decrease on PE activity from 25.2 to 3.6 % between US and MS as the temperature rose from 20 to 50 °C. We observed that at 30 °C, the difference in PE activity on US and MS was 10.3 %, showing that US helped to increase PE activity. Nevertheless, at 60 °C the PE activity was higher than that at 30 °C, but the difference between US and MS was only 0.5 %, showing that temperature affected PE activity more than ultrasound. This could be explain by the several effects of US on the liquid phase, as the physical and chemical effects of cavitation, and also the enzymes interactions and structure binding denaturation [20,43,44].

In contrast, the variation on thermodynamic parameters to XLN and CE indicated that the activities were enhanced by US with the rise of the reaction temperature. This is possibly due to the combined effects of US/temperature on the substrates (cellulose and xylan) chains, which contribute to the enzyme-substrate accessibility improvement under ultrasound treatment.

4 CONCLUSION

In the present work, we demonstrated how ultrasound affects pectinase, cellulase and xylanase activity. In general, ultrasound increased the enzyme activities, resulting in a faster and efficient hydrolysis process. Ultrasound favored PE activity mainly at lower temperatures, on the other hand, CE and XLN showed better results at higher temperatures on ultrasound. Ultrasound also affected the substrates. When xylan and cellulose were submitted to sonication previous to enzyme reaction, the activity increase in both agitation systems, showing that ultrasound can modify the substrate structure easing the access to active site. The enzymatic kinetics indicated that US increased the efficiency and V_{max} of substrate conversion, as well as the enzymes exhibited a better affinity to the substrate under sonication. This research suggested the potential benefits of ultrasound treatment on reaction rate and catalytic efficiency improvement, as well as better responses on thermodynamic parameters and pectinase, cellulase and xylanase activity.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Mr. Ramiro Martínez (Novozymes, Spain) and LNF Latinoamericana for kindly supplying the enzymes used in this research.

Funding: This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq - Brazil) [process 403505/2013-5] and scholarship from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES - Brazil).

REFERENCES

- [1] T.S. Awad, H.A. Moharram, O.E. Shaltout, D. Asker, M.M. Youssef, Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review, *Food Res. Int.* 48 (2012) 410–427.
- [2] C.P. O'Donnell, B.K. Tiwari, P. Bourke, P.J. Cullen, Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance, *Trends Food Sci. Technol.* 21 (2010) 358–367. doi:10.1016/j.tifs.2010.04.007.
- [3] S.R. Shirsath, S.H. Sonawane, P.R. Gogate, Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status, *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 53 (2012) 10–23. doi:10.1016/j.cep.2012.01.003.
- [4] H. Feng, G. V Barbosa-Cánovas, J. Weiss, A. Mulet, J.A. Cárcel, J.V. García-pérez, E. Riera, *Ultrasound technologies for food and bioprocessing*, Springer, 2011. doi:10.1007/978-1-4419-7472-3.
- [5] M.R. González-Centeno, F. Comas-Serra, A. Femenia, C. Rosselló, S. Simal, Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): experimental kinetics and modeling, *Ultrason. Sonochem.* 22 (2015) 506–514.
- [6] J. V. Sinisterra, Application of ultrasound to biotechnology: an overview., *Ultrasonics.* 30 (1992) 180–185. doi:10.1016/0041-624X(92)90070-3.
- [7] A.B. Martins, M.F. Schein, J.L.R. Friedrich, R. Fernandez-Lafuente, M.A.Z. Ayub, R.C. Rodrigues, Ultrasound-assisted butyl acetate synthesis catalyzed by Novozym 435: Enhanced activity and operational stability, *Ultrason. Sonochem.* 20 (2013) 1155–1160. doi:10.1016/j.ultsonch.2013.01.018.
- [8] D. Pingret, A.-S. Fabiano-Tixier, F. Chemat, Degradation during application of ultrasound in food processing: a review, *Food Control.* 31 (2013) 593–606.
- [9] S. Kentish, M. Ashokkumar, The physical and chemical effects of ultrasound, in: *Ultrasound Technol. Food Bioprocess.*, Springer, 2011: pp. 1–12.
- [10] D. Knorr, A. Froehling, H. Jaeger, K. Reineke, O. Schlueter, K. Schoessler, Emerging technologies in food processing, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2 (2011) 203–235. doi:DOI 10.1146/annurev.food.102308.124129.
- [11] F. Chemat, Zill-E-Huma, M.K. Khan, Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction, *Ultrason. Sonochem.* 18 (2011) 813–835. doi:10.1016/j.ultsonch.2010.11.023.
- [12] R. Mawson, M. Gamage, N.S. Terefe, K. Knoerzer, Ultrasound in enzyme activation and inactivation, in: *Ultrasound Technol. Food Bioprocess.*, Springer, 2011: pp. 369–404.

- [13] M.M. Delgado-Povedano, M.D. Luque de Castro, M.D.L. de Castro, A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship, *Anal. Chim. Acta.* 889 (2015) 1–21. doi:10.1016/j.aca.2015.05.004.
- [14] D. Fachin, A.M. Van Loey, B. Ly Nguyen, I. Verlent, A. Indrawati, M.E. Hendrickx, Inactivation kinetics of polygalacturonase in tomato juice, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 4 (2003) 135–142. doi:10.1016/S1466-8564(02)00090-5.
- [15] M.N. Islam, M. Zhang, B. Adhikari, The Inactivation of Enzymes by Ultrasound—A Review of Potential Mechanisms, *Food Rev. Int.* 30 (2014) 1–21. doi:10.1080/87559129.2013.853772.
- [16] S. Aghajanzadeh, A.M. Ziaifar, M. Kashaninejad, Y. Maghsoudlou, E. Esmailzadeh, Thermal inactivation kinetic of pectin methylesterase and cloud stability in sour orange juice, *J. Food Eng.* 185 (2016) 72–77. doi:10.1016/j.jfoodeng.2016.04.004.
- [17] X. Ma, W. Wang, M. Zou, T. Ding, X. Ye, D. Liu, Properties and structures of commercial polygalacturonase with ultrasound treatment: role of ultrasound in enzyme activation, *RSC Adv.* 5 (2015) 107591–107600.
- [18] Z.L. Yu, W.C. Zeng, W.H. Zhang, X.P. Liao, B. Shi, Effect of ultrasound on the activity and conformation of α -amylase, papain and pepsin, *Ultrason. Sonochem.* 21 (2014) 930–936. doi:10.1016/j.ultsonch.2013.11.002.
- [19] T.J. Mason, L. Paniwnyk, J.P. Lorimer, The uses of ultrasound in food technology, *Ultrason. Sonochem.* 3 (1996) S253–S260. doi:10.1016/S1350-4177(96)00034-X.
- [20] F. Zhu, Impact of ultrasound on structure, physicochemical properties, modifications, and applications of starch, *Trends Food Sci. Technol.* 43 (2015) 1–17. doi:10.1016/j.tifs.2014.12.008.
- [21] E. V. Rokhina, P. Lens, J. Virkutyte, Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art, *Trends Biotechnol.* 27 (2009) 298–306. doi:10.1016/j.tibtech.2009.02.001.
- [22] O.E. Szabó, E. Csiszár, The effect of low-frequency ultrasound on the activity and efficiency of a commercial cellulase enzyme, *Carbohydr. Polym.* 98 (2013) 1483–1489.
- [23] Q.K. Beg, M. Kapoor, L. Mahajan, G.S. Hoondal, Microbial xylanases and their industrial applications: A review, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 (2001) 326–338. doi:10.1007/s002530100704.
- [24] M.E. Himmel, J.O. Baker, W.S. Adney, S.R. Decker, N. Renewable, D. National, R. Energy, *Cellulases, Hemicellulases, and Pectinases*, (2007).
- [25] M.K. Bhat, Cellulases and related enzymes in biotechnology, *Biotechnol. Adv.* 18 (2000) 355–383. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00041-0.

- [26] J. Polaina, A.P. MacCabe, *Industrial enzymes: Structure, function and applications*, 2007. doi:10.1007/1-4020-5377-0.
- [27] I. Alkorta, C. Garbisu, M.J. Llama, J.L. Serra, *Industrial applications of pectic enzymes: a review*, *Process Biochem.* 33 (1998) 21–28.
- [28] S. Ahlawat, B. Battan, S. Sudha, D. Jitender, S.S. Dhiman, J. Sharma, R.P. Mandhan, *Production of thermostable pectinase and xylanase for their potential application in bleaching of kraft pulp*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34 (2007) 763–770. doi:10.1007/s10295-007-0251-3.
- [29] A.R. Tapre, R.K. Jain, *Pectinases: Enzymes for fruit processing industry*, *Int. Food Res. J.* 21 (2014) 447–453.
- [30] G.L. Miller, *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426–428.
- [31] L. Dal Magro, D. Goetze, C.T. Ribeiro, N. Paludo, E. Rodrigues, P.F. Hertz, M.P. Klein, R.C. Rodrigues, *Identification of bioactive compounds from Vitis labrusca L. variety concord grape juice treated with commercial enzymes: Improved yield and quality parameters*, *Food Bioprocess Technol.* 9 (2016) 365–377. doi:10.1007/s11947-015-1634-5.
- [32] M.J. Bailey, P. Biely, K. Poutanen, *Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity*, *J. Biotechnol.* 23 (1992) 257–270.
- [33] X. Ma, D. Wang, M. Yin, J. Lucente, W. Wang, T. Ding, X. Ye, D. Liu, *Characteristics of pectinase treated with ultrasound both during and after the immobilization process*, *Ultrason. - Sonochemistry.* 36 (2017) 1–10. doi:10.1016/j.ultsonch.2016.10.026.
- [34] J.J. Virgen-Ortíz, V. Ibarra-Junquera, P. Escalante-Minakata, J.D.J. Ornelas-Paz, J.A. Osuna-Castro, A. González-Potes, *Kinetics and thermodynamic of the purified dextranase from Chaetomium erraticum*, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 122 (2015) 80–86. doi:10.1016/j.molcatb.2015.08.020.
- [35] X. Ma, W. Wang, D. Wang, T. Ding, X. Ye, D. Liu, *Degradation kinetics and structural characteristics of pectin under simultaneous sonochemical-enzymatic functions*, *Carbohydr. Polym.* 154 (2016) 176–185. doi:10.1016/j.carbpol.2016.08.010.
- [36] H.U. Rehman, A. Aman, M.A. Nawaz, S.A.U. Qader, *Characterization of pectin degrading polygalacturonase produced by Bacillus licheniformis KIBGE-IB21*, *Food Hydrocoll.* 43 (2015) 819–824. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.08.018.
- [37] Z. Wang, X. Lin, P. Li, J. Zhang, S. Wang, H. Ma, *Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment*, *Bioresour. Technol.* 117 (2012) 222–227. doi:10.1016/j.biortech.2012.04.015.
- [38] P.B. Subhedar, P.R. Gogate, *Enhancing the activity of cellulase enzyme using ultrasonic irradiations*, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 101 (2014) 108–114.

doi:10.1016/j.molcatb.2014.01.002.

- [39] M. Mandels, Applications of cellulases, *Biochem. Soc. Trans.* 13 (1985) 414–416.
- [40] P.P.T. Tran, V.V.M. Le, Effects of ultrasound on catalytic efficiency of pectinase preparation during the treatment of pineapple mash in juice processing, *Int. Food Res. J.* 18 (2011) 347–354.
- [41] J. Yan, G. Pan, C. Ding, G. Quan, Kinetic and thermodynamic parameters of beta-glucosidase immobilized on various colloidal particles from a paddy soil., *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 79 (2010) 298–303. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.04.015.
- [42] B.K. Tiwari, K. Muthukumarappan, C.P. O'Donnell, P.J. Cullen, Inactivation kinetics of pectin methylesterase and cloud retention in sonicated orange juice, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 10 (2009) 166–171. doi:10.1016/j.ifset.2008.11.006.
- [43] T.J. Mason, E. Riera, A. Vercet, P. Lopez-Buesa, Application of ultrasound, *Emerg. Technol. Food Process.* 32 (2005) 3–351.
- [44] M. Ashokkumar, Applications of ultrasound in food and bioprocessing, *Ultrason. Sonochem.* 25 (2015) 17–23. doi:10.1016/j.ultsonch.2014.08.012.

CAPÍTULO V

6 DISCUSSÃO GERAL

Na indústria vitícola, preparados enzimáticos são utilizados no processo de extração com o objetivo de aumentar o rendimento e melhorar a extração de cor e compostos. A uva *in natura* já possui enzimas com tais finalidades, no entanto, elas são inibidas pelas condições do meio de vinificação, sendo necessária a aplicação de enzimas exógenas. Uma alternativa em potencial para aprimorar o processo de extração do mosto, é a aplicação de ultrassom, que além de ser uma tecnologia sustentável, têm apresentado bons resultados no processamento de alimentos, incluindo maiores rendimentos de extração, tempos de processamento mais curtos, redução de custos de operação, entre outros.

Com isso, este trabalho objetivou avaliar os efeitos combinados do ultrassom, agitação mecânica e tratamento enzimático na extração de mosto da uva Cabernet Sauvignon. Inicialmente, nove preparados enzimáticos comerciais foram caracterizados de acordo com as suas atividades de pectinase total, poligalacturonase, pectinase, pectinametilsterase, celulase e xilanase, e então, foram padronizados por unidades (U) de pectinase total para aplicação no mosto. Os preparados apresentaram diferentes relações entre as atividades avaliadas, tendo destaque para os preparados Pectinex Ultraclear®; Lallzyme Beta® e Zimopec PX5® os quais apresentaram as maiores atividades enzimáticas para as principais enzimas utilizadas no processo de maceração/extração do mosto; pectinase, celulase e xilanase.

Em seguida, foram avaliados os parâmetros tempo (15 e 30 min), temperatura (40, 50 e 60 °C) e concentração de enzima (0,01 – 2,0 U.g⁻¹) na extração do mosto utilizando os diferentes preparados enzimáticos combinados com a aplicação do ultrassom ou agitação mecânica. Em tempos e temperaturas elevadas, obteve-se uma maior capacidade reductora e sólidos solúveis totais, enquanto que em temperaturas inferiores, o rendimento do mosto foi maior. No entanto, a utilização de ultrassom no processo permitiu melhorar a extração de compostos antioxidantes e °Brix em temperaturas mais brandas, quando comparadas ao tratamento em banho agitado.

Com base nos dados obtidos, os preparados Pectinex Ultra Clear®, Lallzyme Beta® e Zimopec PX5® apresentaram os melhores resultados em relação a extração do mosto, e foram submetidos a um estudo sobre a concentração de enzima ideal a ser utilizada nas condições pré-definidas (50 °C e 30 min). O preparado Zimopec PX5® apresentou os melhores resultados considerando todos os parâmetros avaliados, assim como uma boa relação entre as principais atividades enzimáticas determinadas, sendo selecionado para a continuação dos experimentos.

Na segunda etapa do trabalho, tratamentos combinando a aplicação de ultrassom, agitação mecânica e enzimas foram realizados a fim de verificar a influência de cada método na extração do mosto. Para isso, foram avaliados os parâmetros de qualidade: cor, sólidos solúveis totais, rendimento, açúcares redutores, acidez total, pH, capacidade redutora e atividade antioxidante. Os compostos fenólicos e antocianinas foram identificados e quantificados por HPLC-DAD-MS.

Todos os parâmetros de qualidade do mosto foram melhorados com a aplicação do tratamento enzimático, sendo seu efeito mais evidente nos ensaios conduzidos no banho agitado. O tratamento por ultrassom se mostrou eficiente quando aplicado sozinho, onde mesmo sem a presença de enzimas foram obtidos resultados superiores à extração pelo método convencional, porém, quando combinado com enzimas, obteve-se um aumento ainda maior na extração de cor e atividade antioxidante.

Nos ensaios onde os dois métodos de agitação foram combinados (MS e US), o mesmo comportamento foi observado. As extrações iniciadas no banho agitado seguido por ultrassom (MSUS - 0 e MSUS - E) obtiveram maiores valores de TSS e açúcares redutores, mostrando que esse método favoreceu a extração de açúcares, enquanto que os ensaios realizados primeiramente no ultrassom (USMS - 0 e USMS - E) obtiveram maior efeito sobre a capacidade redutora e atividade antioxidante.

A aplicação inicial de ultrassom pode ter promovido uma maior degradação das células, favorecendo uma maior extração de compostos fenólicos das cascas. Isso também pode ser conferido comparando os ensaios combinados com e sem a aplicação de enzima. O tratamento enzimático contribuiu de forma mais efetiva nos

ensaios iniciados no banho agitado, com aumento de praticamente todos os parâmetros avaliados. No entanto, nos tratamentos iniciados no ultrassom a aplicação do preparado enzimático não gerou maiores ganhos de qualidade, mostrando que o ultrassom quando aplicado antes, e combinado com a agitação mecânica, já é eficiente para obtenção de mosto com excelente qualidade. No geral, não houve diferenças significativas nas extrações quanto ao método de agitação aplicado primeiro, porém a combinação deles com o tratamento enzimático resultaram em melhores resultados dos parâmetros avaliados.

Com esse trabalho, pôde-se concluir que o preparado mais eficiente para extração do mosto quando se visa maiores rendimentos e compostos antioxidantes foi o Zimopec PX5®, assim como, a avaliação dos parâmetros tempo, temperatura e concentração de enzima é importante para otimizar a extração do mosto quando se visa um produto com características específicas. A aplicação do ultrassom proporcionou melhores resultados em condições mais brandas de processamento, assim como foi observado um efeito sinérgico entre os tratamentos combinando as três técnicas, mostrando ser uma alternativa potencial ao tratamento térmico de extração.

Tendo em vista os resultados obtidos no primeiro trabalho onde foi observado um efeito positivo do ultrassom combinado com o tratamento enzimático, um segundo trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a influência do ultrassom na atividade individual das principais enzimas requeridas durante o processo, pectinase, xilanase e celulase, e compreender melhor os efeitos do ultrassom.

Por muito tempo o ultrassom foi utilizado como uma técnica para inativação de enzimas, principalmente na indústria alimentícia. Os efeitos da cavitação, assim como a elevada frequência e intensidade podem promover a formação de radicais livres e alterações bruscas na estrutura da enzima, levando a sua desnaturação. Contudo, a interferência destes efeitos é fortemente dependente da intensidade e duração do ultrassom. Alguns estudos têm mostrado resultados positivos sobre a eficiência do ultrassom combinado ao tratamento enzimático, o qual proporciona melhor transferência de massa e melhora na eficiência das enzimas.

Inicialmente, as atividades de PE, XLN e CE foram determinadas em meios com diferentes pHs (3,0 a 7,0) e sob a aplicação do ultrassom. Sabe-se que cada

enzima possui uma faixa ótima de pH, sendo a maioria sensível a pHs extremos. As atividades de pectinase, xilanase e celulase apresentaram perfis similares no banho agitado e no ultrassom, no entanto, a aplicação do ultrassom mostrou efeito protetivo às enzimas, preservando sua integridade e atividade em pH adversos. Nas reações conduzidas no US, obteve-se um aumento de 5,6; 21,2 e 15,7 % para PE, XLN e CE, respectivamente, para os pHs onde as enzimas apresentaram maior influência do meio, comparado com as reações conduzidas no MS.

Por conseguinte, as soluções de substratos (pectina, papel filtro e xilana) e enzimas foram sonicadas por tempos pré-determinados (0, 1, 5, 10, 15 e 30 min), para verificar o efeito do US, tanto no substrato, quanto na enzima, e realizar testes de atividade enzimática combinando as soluções pré-sonicadas.

A sonicação da solução enzimática apresentou um efeito positivo na atividade de pectinase e celulase, especialmente quando a reação ocorreu no US, mostrando que a sonicação pode proporcionar a ativação das enzimas através de modificações na sua estrutura, tornando a enzima mais propensa a reação de hidrólise. Por outro lado, a xilanase mostrou melhores resultados quando a solução de substrato foi pré-sonicada, e a reação realizada no US, chegando a um aumento de 25 % no tempo de 5 min. Uma possível explicação, é que o ultrassom pode ter agido na cadeia da xilana, reduzindo seu tamanho e facilitando a ligação entre enzima e substrato. Isso se conclui, pois tanto na reação ocorrida no banho, quanto no ultrassom, a atividade de xilanase foi maior com a prévia sonicação do substrato.

Para melhor compreender os efeitos do ultrassom na atividade das enzimas, foram conduzidos estudos sobre os parâmetros cinéticos e termodinâmicos. Para avaliação do estudo cinético, as atividades de pectinase, xilanase e celulase foram determinadas variando a concentração dos substratos de 0,05 a 10; 1 a 25; e 2,5 a 100 mg.mL⁻¹, respectivamente, e determinados os parâmetros de velocidade máxima de reação (V_{max}), constante de Michaelis-Menten (K_m) e eficiência catalítica (V_{max}/K_m).

Com a aplicação do ultrassom, o K_m para pectinase diminuiu, indicando que ocorreu um aumento da afinidade entre a enzima e o substrato, porém, a V_{max} não apresentou diferenças significativas nas reações conduzidas no US e MS. Por outro lado, os resultados estimados para xilanase e celulase obtiveram comportamentos

opostos, pois ambas as enzimas apresentaram maiores V_{max} nas reações realizadas no ultrassom, e valores relativamente maiores de K_m . Entretanto, a eficiência catalítica para todas as enzimas foi superior no tratamento com ultrassom.

Os resultados deste estudo estão em concordância com o anterior, onde percebe-se que de fato houve um efeito positivo do tratamento por ultrassom na atividade das enzimas, ou por ação direta na estrutura molecular da enzima, ou por desdobramento do substrato, levando à um aumento da eficiência catalítica e liberação de produto mais rapidamente.

Para melhor compreender os mecanismos das enzimas, e os efeitos da temperatura, a determinação dos parâmetros termodinâmicos foi realizada. As reações foram conduzidas na faixa de temperatura de 30 a 60 °C, e foram avaliados os parâmetros de energia de ativação (E_a); energia livre de Gibbs (ΔG); entalpia (ΔH); e entropia (ΔS).

A energia de ativação, que determina a sensibilidade da reação em função da temperatura, é calculada pela inclinação da curva baseada na equação de Arrhenius. A E_a para as reações conduzidas no US apresentou menor valor para as PE e maior para CE e XLN. A teoria indica que quanto menor a energia de ativação, mais rápida ocorre a reação química. No entanto, mesmo obtendo um valor maior de E_a , a atividade de CE e XLN foram maiores no US com o aumento da temperatura, o que gerou uma maior variação entre as atividades mínima e máxima, alterando a inclinação da curva.

Devido às mudanças na inclinação da curva, os valores de entalpia apresentaram os mesmos comportamentos. A entropia do sistema, que está associada com o número de moléculas com energia suficiente para realizar uma reação, apresentaram valores maiores para PE, sugerindo que pode ter ocorrido inativação da enzima pelo US. Por outro lado, obtiveram-se valores menores para CE e XLN nos tratamentos por US. Nas reações realizadas no ultrassom, todas as enzimas apresentaram menores valores de ΔG , sugerindo que as reações foram promovidas pela sonicação, e a conversão do substrato em produto foi mais eficiente.

Com base nos resultados obtidos onde mostra-se que a atividade de pectinase foi melhor em temperaturas mais baixas, é possível explicar o fato de que

a extração do mosto obteve maiores rendimentos em temperaturas mais brandas, tendo em vista que a aplicação dessa enzima está relacionada, principalmente, a maiores rendimentos de extração. Do mesmo modo, as atividades de CE e XLN foram melhoradas em altas temperaturas, e estão relacionadas a maior extração de cor e compostos fenólicos, explicando o fato de que em maiores temperaturas ocorreu um aumento na extração de cor e atividade antioxidante dos mostos de uva.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos e apresentados nos dois artigos pode-se afirmar que o trabalho cumpriu com os objetivos propostos, mostrando que o ultrassom pode ser utilizado como uma técnica alternativa para melhorias no processo, bem como potencializar a atividade das enzimas durante o tratamento enzimático.

As principais conclusões obtidas foram:

- O preparado enzimático Zimopec PX5® apresentou os melhores resultados, em relação aos demais, quanto atividade enzimática e extração do mosto.
- A avaliação dos parâmetros tempo, temperatura e concentração de enzima são importantes ferramentas para uma melhor extração do mosto, tendo em vista as características do produto esperado.
- A aplicação do ultrassom permitiu a obtenção de mosto com propriedades similares ou ainda melhores que a extração convencional, mesmo em temperaturas mais brandas.
- A combinação entre o tratamento enzimático, banho agitado e ultrassom apresentou ótimos resultados, melhorando a extração do mosto e os parâmetros de qualidade, mostrando ser uma alternativa para aprimorar o processo de extração.
- O ultrassom, aplicado individualmente, apresentou efeitos positivos no processo de extração do mosto da uva.
- A atividade de pectinase foi melhor com a aplicação do ultrassom em baixas temperaturas, já a celulase e a xilanase apresentaram melhores resultados em temperaturas mais elevadas.
- A sonicação prévia do substrato contribuiu para um aumento da atividade enzimática de celulase e xilanase.
- A tecnologia de ultrassom se mostrou promissora para aplicação na indústria vitícola, bem como em outras áreas de aplicação das enzimas avaliadas.

Portanto, os resultados obtidos nesta dissertação de mestrado apresentam contribuições relevantes no campo do desenvolvimento tecnológico, tendo em vista que cada vez mais busca-se inovação de processos, e técnicas mais sustentáveis.

Tendo em vista os resultados obtidos, abrem-se possibilidades para trabalhos futuros visando a aplicação do ultrassom em outros processos da indústria. Uma das ideias sugeridas é a realização da vinificação dos mostos obtidos pelos tratamentos testados no trabalho, almejando obter um estudo completo sobre o uso do ultrassom na extração, e vinificação do mosto de Cabernet Sauvignon.

Além disso, outra possibilidade de trabalho é a avaliação de diferentes frequências e potências do ultrassom, bem como os efeitos do uso simultâneo do ultrassom com a agitação mecânica, ou uso intermitente entre agitação e ultrassom.

APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR ARTIGO I

ONLINE RESOURCES

Combination of ultrasound, enzymes and mechanical stirring: a new method to improve *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon must yield, quality and bioactive compounds

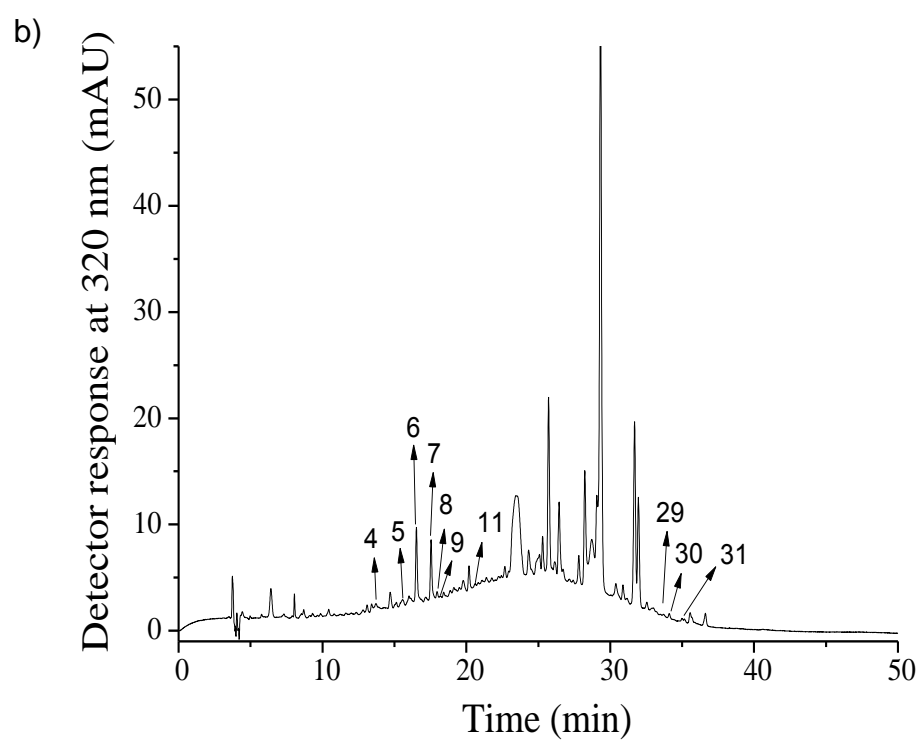
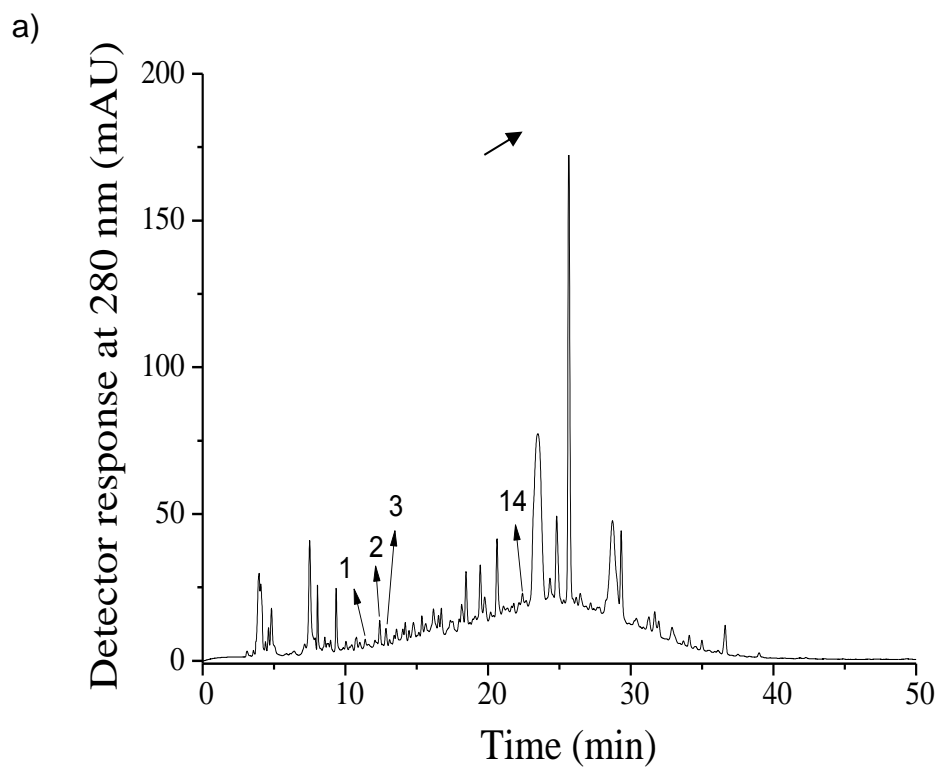
Luíza M. G. Dalagnol¹, Lucas Dal Magro¹, Vitória C. C. Silveira¹, Eliseu Rodrigues², Vitor Manfroi³, Rafael C. Rodrigues^{1,*}

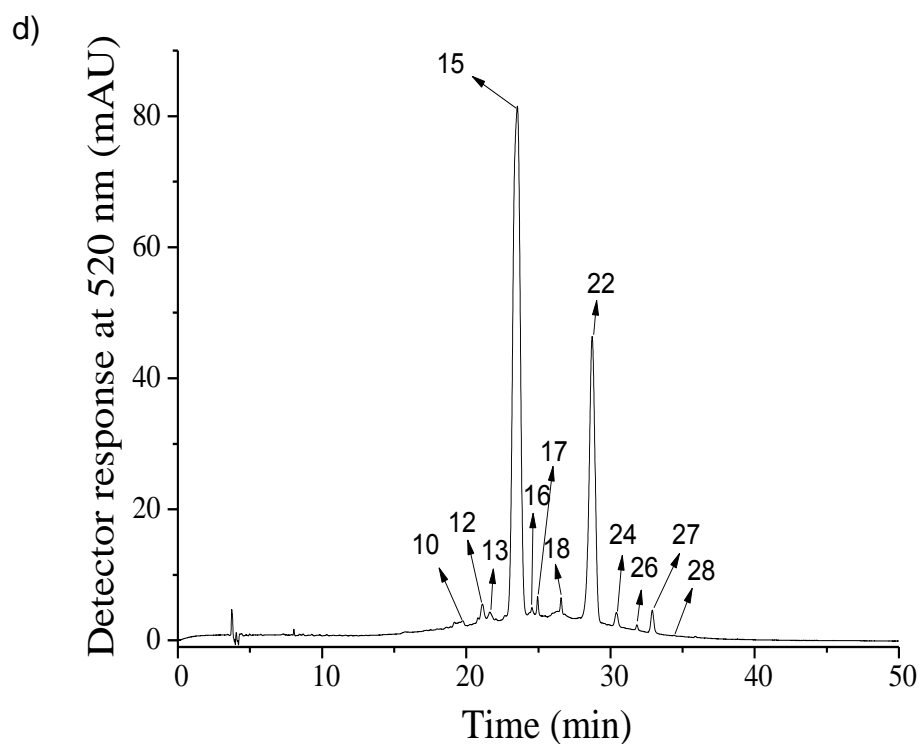
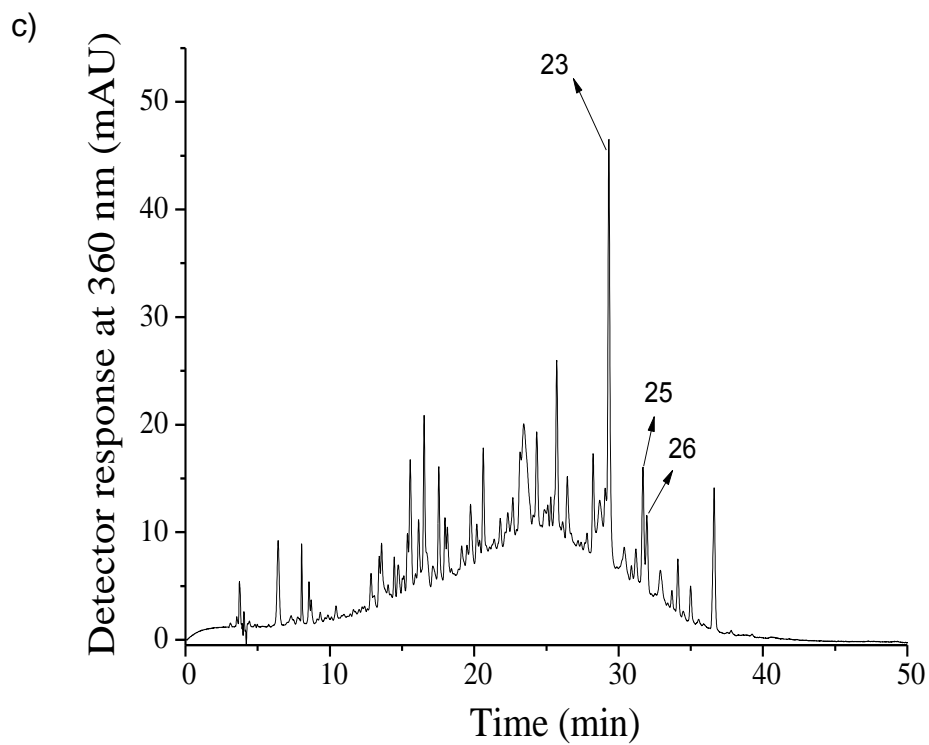
¹*Biotechnology, Bioprocess and Biocatalysis Group, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.*

²*Laboratory of Natural Antioxidants, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul.*

³*Beverages Technology Lab, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul.*

* Corresponding author: Prof. Dr. Rafael C. Rodrigues, rafaelcrodrigues@ufrgs.br - www.ufrgs.br/bbb





Online Resource 1. HPLC chromatograms of phenolic compounds in Cabernet Sauvignon must, processed at (a) 280 nm; (b) 320 nm; (c) 360 nm and (d) 520 nm. Each peak numbered was identified and described in Tables S1 and S2.

Online Resource 2. Chromatographic, UV–vis, and mass spectroscopy characteristics of phenolic compounds in grape must, obtained by HPLC-DAD-MS.

Peaks	Compound	t_R (min) ^a	λ_{max} (nm) ^b	[M-H] ⁻	MS ² (-) (m/z) ^c
1	Galloylhexoside I	11.5	281	331.0089	168.8997, 124.8720
2	Gallic acid	12.4	269	168.8989	124.8740
3	Not identified 1	12.8	290	359.0107	124.8756
4	Caffeic acid derivative I	13.6	288, 320	635.1317	341.0316, 178.9198
5	<i>p</i> -Coumaric acid derivative I	15.4	288, 300	457.0640	162.9152
6	2-S-Glutathionyl caffeoyl tartaric acid	16.5	325	616.1261	148.8837, 272.0256
7	Feruloyl hexoside	17.5	328	355.0156	192.9043
8	Caffeoyl hexoside pentoside	17.9	282, 320	473.0346	341.0304, 178.9206
9	<i>p</i> -coumaric acid derivative II	18.1	284, 306	361.0192	162.9167, 118.9001
11	<i>p</i> -coumaric acid derivative III	20.6	281, 306	361.0192	162.9153, 118.8962
14	Proanthocyanidin dimer	22.6	279	577.1187	289.8295 (<i>source</i>)
23	Quercetin hexoside I	29.3	353	463.0592	300.9593, 178.8838
	Quercetin hexoside II		353	463.0592	300.9593
25	Kaempferol hexoside	31.7	353	447.0798	283.9746
26	Rhamnetin hexoside	31.9	349	477.0964	477.0903, 313.9948, 283.9718
29	Caffeic acid derivative II	33.7	279/310	630.1352	178.9429, 132.8700
30	Caffeic acid derivative III	34.1	278/ 310	630.1350	178.9413, 132.7256
31	Caffeic acid derivative IV	34.9	279/ 311	630.1353	178.9209, 132.8879

Online Resource 3. Chromatographic, UV–vis, and mass spectroscopy characteristics of anthocyanins content in grape must, obtained by HPLC-DAD-MS.

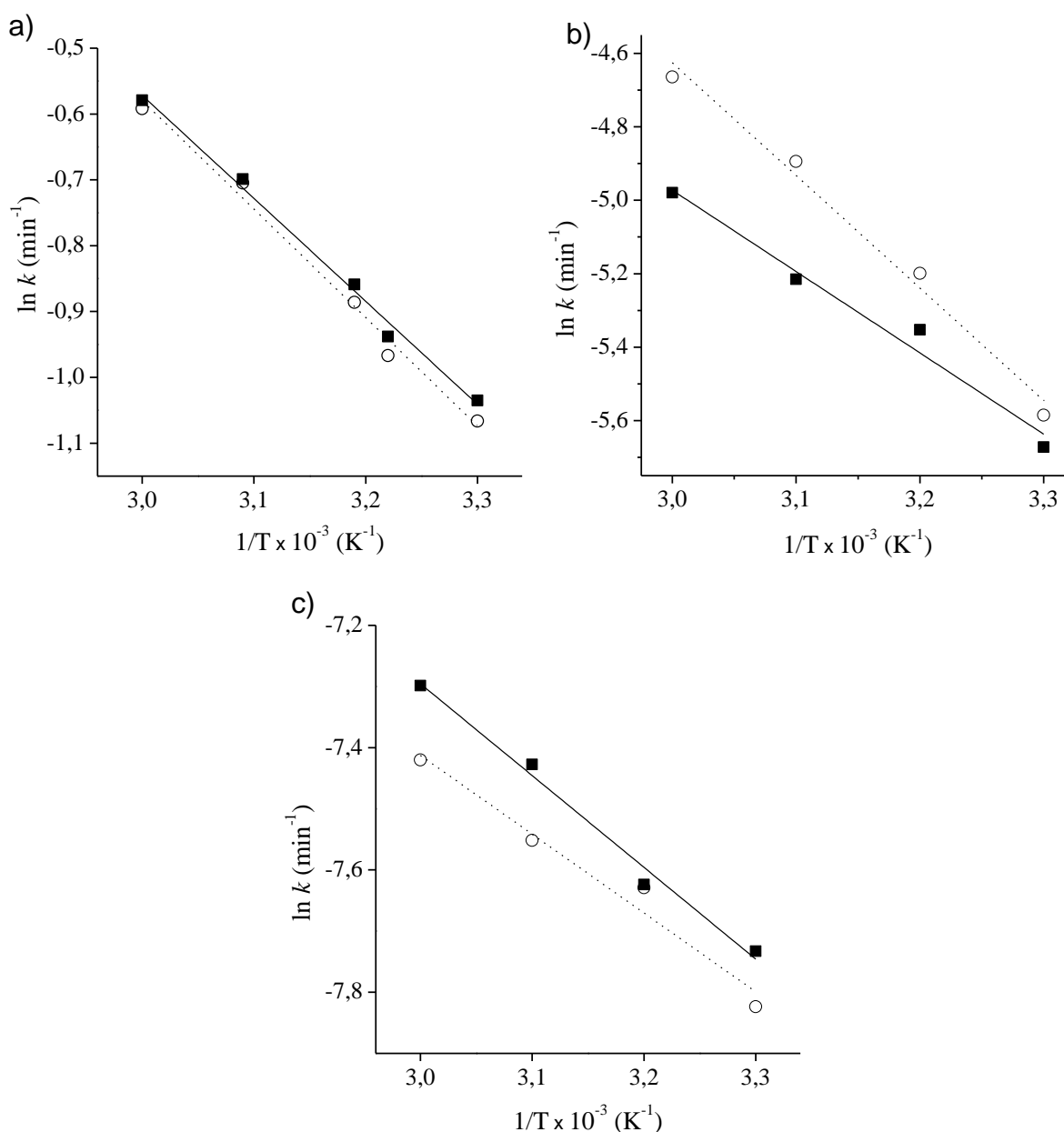
Peaks	Compound	t _R (min) ^a	λ _{max} (nm) ^b	[M] ⁺	MS ² (+) (m/z) ^c
10	Delphinidin 3-O-hexoside	19.5	280/529	465.1018	303.0492
12	Cyanidin 3-O-glucoside	21.2	278/520	449.1099	287.0557
13	Petunidin 3-O-glucoside	21.7	279/529	479.1158	317.0653
15	Peonidin 3-O-glucoside	23.5	277/527	463.1215	301.0712
	Malvidin 3-O-glucoside	23.5	277/527	493.1351	331.0834
	Vitisin A - delphinidin -3-glucoside	23.5	277/527	533.1241	515.1123 /371.0711 /184.0310
16	Delphinidin 3-O-6-O-acetyl-glucoside	24.8	-	507.1089	303.0477
17	Malvidin 3-glucoside-pyruvate	25.0	-	561.1282	399.0739
18	Myricetin 3-hexoside	26.5	275/515	481.1006	319.0444
19	Cyanidin 3-O-6-O-acetyl-glucoside	26.6	-	491.1111	331.0711 /287.0526
20	Malvidin 3-6-O-acetylglucoside-pyruvate	26.7	-	603.135	399.0737
21	Petunidin 3-O-6- acetyl-hexoside	26.9	-	521.1253	317.0642
22	Malvidin 3-O-6-O-acetyl-glucoside	28.7	277/528	535.1441	331.0826
	Peonidin 3-O-6-O-acetyl-glucoside	28.7	277/528	505.1313	301.0701
24	Cyanidin 3-O-glucoside	31.6	268/533	449.1095	287.0552
26	<i>Trans</i> - Malvidin 3-O-6-O-coumaryl-glucoside	31.9	278/529	639.1743	331.0833
	Petunidin 3-O-hexoside	31.9	268/533	479.1212	317.0680
27	Peonidin -3-6-O-coumaryl-glucoside	32.9	282/528	609.1566	301.0695
	<i>Cis</i> –Malvidin 3-O-6-O-coumaryl-glucoside	32.9	282/528	639.6232	331.0803
28	Peonidin 3-caffeoyl-glucoside	33.4	278/529	625.1546	301.0691
	Malvidin 3-caffeoyl-glucoside	33.4	278/529	655.1589	331.0680

APÊNDICE B – MATERIAL SUPLEMENTAR ARTIGO II

ONLINE RESOURCES

Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters

Luíza M. G. Dalagnol¹, Vitória C. C. Silveira¹, Halisson Baron¹, Vitor Manfroiz², Rafael C. Rodrigues^{1*}



Online Resource 1- Relationship between $\ln(k)$ and $(1/T)$ for (a) pectinase, (b) xylanase and (c) cellulase hydrolysis reaction on (■) ultrasound and on (○) stirring bath.