



Universidade de Aveiro Departamento de Química

Ano 2011/2012

**José Maria de
Mascarenhas Gaivão
Correia Neves**

**Efeito de uma pectina metilesterase na firmeza de
pedaços de morango**



**José Maria de
Mascarenhas Gaivão
Correia Neves**

**Efeito de uma pectina metilesterase na firmeza de
pedaços de morango**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica do Dr. Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva, Professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Dr. Domingos Almeida, Diretor do departamento de inovação e tecnologia da Frulact, S.A.

Aos meus pais e irmã

o júri

Presidente

Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva
Investigador auxiliar da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva
Professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Domingos Paulo Ferreira de Almeida
Professor auxiliar da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Prof. Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo
Professora associada com agregação da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço ao Doutor Manuel António Coimbra, do Departamento de Química da universidade de Aveiro, por ter aceite a orientação deste trabalho, pela ajuda, disponibilidade e entusiasmo dispensado.

Agradeço ao Doutor Domingos Almeida, da empresa Frulact pela proposta do tema de investigação, pelo apoio e acompanhamento constante.

Agradeço à Frulact por me ter acolhido e dado todas as condições necessárias para a realização do trabalho

Agradeço a todos os colegas da Frulact pelos conhecimentos transmitidos disponibilidade e paciência

Agradeço aos meus pais pelo constante apoio, à família e aos amigos.

palavras-chave

Morango, polissacarídeos pécticos, pectina metilesterase, textura, firmeza, tempo, temperatura modelo matemático, análise sensorial

resumo

Os frutos são alimentos fundamentais na alimentação humana e são largamente consumidos em todo o mundo. Parte do consumo é feito na forma de frutos processados aplicados nos mais diversos produtos alimentares como iogurte, gelados, pastelaria, compotas, sumos etc. O processamento dos frutos provoca uma alteração das propriedades organoléticas especialmente na textura, devido a alterações na parede celular e principalmente na lamela média. As homogalacturonanas, um dos polissacarídeos pécticos presentes na lamela média, quando desesterificadas tem capacidade de formar ligações com catiões de Ca^{2+} formando assim um gel. Essa desesterificação pode ocorrer através da ação da pectina metilesterase (PME). A atividade da PME em conjunto com a adição de iões de cálcio pode trazer aumento da firmeza aos frutos processados.

Neste trabalho foi testado o efeito provocado por uma PME em pedaços de morango. O trabalho focou-se na influência da temperatura de enzimagem ao longo do tempo em termos de firmeza dos pedaços. Foram utilizadas 3 temperaturas de incubação da enzima: 4°C; 25°C e 40°C. Os dados obtidos foram adaptados ao modelo matemático de one-phase association que relaciona a firmeza dos pedaços em função do tempo através de uma constante de velocidade de enzimagem, k. Para a temperatura de 40°C o tempo necessário para se atingir a firmeza máxima foi de 13 horas. Com o abaixamento da temperatura o tempo necessário para que se atinja a firmeza máxima vai sendo cada vez maior, sendo que a 4°C são necessárias 147 horas.

A firmeza dos pedaços foi avaliada ao longo do processamento dos pedaços até à sua aplicação em iogurte. Foi efetuada uma análise sensorial por forma a criar um perfil de textura para os pedaços de morango e estudar os efeitos da PME ao nível da perceção sensorial.

keywords

Strawberry, pectic polysaccharides, pectin methylesterase, texture, firmness, time, temperature, mathematic modelation, sensory analysis.

abstract

Fruits are essential for human nutrition. They are widely consumed around the world and part of that consumption is done in the form of processed fruits that can be used in many products such as yogurt, ice cream, pastries, jams, juices etc. The processing changes the organoleptic properties of the fruits especially the texture due to changes in the cell wall and especially in the middle lamella. The homogalacturonans are one of the pectic polysaccharides of the middle lamella, that when deesterified have the ability to bond with Ca^{2+} forming a gel. This deesterification may occur through the action of pectin methylesterase (PME). The PME activity in conjunction with the addition of calcium ions can provide an increase of the fruit firmness.

In this work we tested the effect caused by a PME in strawberry pieces. This work focused on influence of temperature over time in terms of firmness of the strawberry pieces. We used three temperatures for the enzyme incubation: 4 °C, 25 °C and 40 °C. The data were adjusted to the mathematical model of one-phase association relating the firmness of the pieces with the time of incubation through an enzyme velocity rate, k . For the temperature of 40 °C the time required to reach maximum of firmness was 13 hours. With lower temperatures the time required to reach the maximum firmness increased, at the temperature of 4 °C it was required 147 hours.

The firmness of the pieces was evaluated throughout the processing of the pieces until their application in yogurt. A sensory analysis was performed in order to create a texture profile for strawberry pieces and studying the effects of the PME in terms of sensory perception.

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Morango.....	2
1.2	Polissacarídeos pécticos.....	3
1.2.1	Reações que ocorrem nas homogalacturonanas	4
1.2.2	Homogalacturonanas e o modelo de “caixa de ovos”	6
1.3	Pectina metilesterase (PME).....	6
1.3.1	Propriedades e polimorfismo.....	7
1.3.2	Propriedades físico-químicas.....	7
1.3.3	Atividade catalítica	8
1.3.4	Função da PME in vivo	9
1.3.5	Relação entre a PME e a PG e a PL	10
1.3.6	Importância da PME na indústria	12
1.4	Textura.....	12
1.4.1	Importância da textura na indústria alimentar	12
1.4.2	Medição da textura	12
2	Materiais e métodos.....	16
2.1	Amostra.....	16
2.2	Enzima	16
2.3	Métodos de enzimação	16
2.3.1	Método de enzimação por imersão.....	16
2.3.2	Método de enzimação por aspersão	17
2.4	Incorporação em preparado e aplicação em iogurte	17
2.5	Medição de firmeza	18
2.6	Caracterização dos retidos	18
2.7	Análise sensorial para determinação do perfil de textura	18

3	Resultados e discussão	19
3.1	Otimização de metodologia de enzimação	19
3.2	Método de enzimação por imersão	20
3.2.1	Influência do pH	20
3.2.2	Influência do tempo	21
3.3	Método de enzimação por aspersão	22
3.3.1	Influência do tempo	22
3.3.2	Comparação com o método de enzimação por imersão	23
3.4	Influência da temperatura e tempo de enzimação na firmeza do morango	23
3.4.1	Modelos matemáticos para 4°C, 25°C e 40°C	26
3.4.2	Correlação da constante de velocidade de enzimação com a temperatura	29
3.5	Aplicação em preparado	31
3.6	Análise sensorial	34
4	Conclusão	40
5	Bibliografia	41

Índice de figuras

Figura 1 Esquema da estrutura dos 4 tipos de polissacarídeos pécnicos existentes, adaptado de [11]	4
Figura 2 principais alterações que ocorrem em HG e o seu resultado em termos de textura, adaptado de [6] ..	5
Figura 3 Modelo “caixa de ovos” a) Agregação de dímeros de cadeias de HG, adaptado de [19] b) Modelo esquemático da coordenação de cálcio com os resíduos de ácido galacturónico no modelo de “caixa de ovos”, adaptado de [17]	6
Figura 4 Reação de catalisação da PME.....	8
Figura 5 Ensaio preliminares para verificar a atuação da enzima.	20
Figura 6 Efeito do pH do tampão na atuação da enzima e na firmeza.....	21
Figura 7 Firmeza em função do tempo para teste a 40°C imerso numa solução tampão	22
Figura 8 Firmeza em função do tempo para o método de aspensão	23
Figura 9 Variação da firmeza ao longo do tempo de enzimagem através do método de aspensão a) 40°C b) 25°C c) 4°C	26
Figura 10 Variação da firmeza ao longo do tempo para as 3 temperaturas utilizadas e a respetiva adaptação ao modelo matemático a) 4°C b) 25°C c) 40°C	27
Figura 11 Representação das equações obtidas para as 3 temperaturas utilizadas	29
Figura 12 Linearização da equação de Arrhenius e a respetiva equação da reta que melhor se ajusta aos 3 pontos	30
Figura 13 Representação da equação de Arrhenius para mostrar a variação da constante de velocidade de enzimagem (k) para o intervalo de temperaturas utilizado.	31
Figura 14 Variação da firmeza ao longo do processamento dos pedaços de morango	32
Figura 15 Distribuição em termos de tamanho dos retidos, em % da massa total de retidos a) após a incorporação dos pedaços em preparado b) após a aplicação em iogurtes.	34
Figura 16 Perfis de textura de pedaços de morango frescos, enzimados e IQF.....	35
Figura 17 Perfis de textura de pedaços de morango enzimados a diferentes temperaturas.	36
Figura 18 Perfis de textura de pedaços de morango enzimados ao longo do tempo à temperatura de 25°C	37
Figura 19 Comparação do perfil de textura de pedaços de morango frescos e enzimados durante 40 minutos a 40 °C.....	38
Figura 20. Comparação dos perfis de textura dos pedaços de morango enzimados e pedaços sem tratamento a) após incorporação em preparado b) após a aplicação em iogurte.....	39

Índice de tabelas

Tabela 1 Estabilidade térmica da poligalacturonase de diferentes plantas, adaptado de [38]	11
Tabela 2 Principais descritores utilizados para alimentos vegetais, adaptado de [41]	14
Tabela 3 Composição da solução tampão adicionada no método de enzimação por imersão	16
Tabela 4 Composição da solução utilizada na enzimação no método por aspersão	17
Tabela 5 Composição do preparado de morango utilizado.	17
Tabela 6 Representação dos dados cinéticos obtidos através do modelo matemático para as 3 temperaturas utilizadas	28
Tabela 7 Condições do tratamento enzimático dos pedaços em cada preparado	32
Tabela 8 Rendimento em massa do morango recuperado nos crivos após incorporação dos pedaços em preparado.	33
Tabela 9 Amostras utilizadas na avaliação da influência da temperatura no perfil de textura	36
Tabela 10 Amostras utilizadas na avaliação da influência do tempo no perfil de textura.	37
Temperatura de enzimação de 25°C	37

Abreviaturas

PME - Pectina metilesterase
PG - Poligalacturonase
PL- Pectina liase
HG - Homogalacturonana
RH-I - Ramnogalacturonanas do tipo I
RG-II - Ramnogalacturonanas do tipo II
XGA - Xilogalacturonanas
GalA - Ácido galacturónico
IQF - Individual Quick Frozen
k - constante de velocidade de enzimagem
 F_{\max} - Firmeza máxima
 F_0 - Firmeza no tempo 0

1 Introdução

A produção mundial de frutos e vegetais tem aumentado nos últimos anos. Desde 1980 até 2004 houve um aumento de consumo de cerca de 0,4% por ano. Nos últimos anos tem havido alteração nos hábitos de consumo assim como um aumento da produção e uma melhoria na qualidade de transporte e armazenamento [1]. Uma vez que a maioria dos frutos são perecíveis é necessário ter em atenção a sua colheita, transporte e processamento de forma a obter a qualidade pretendida de estado de maturação, cor, textura e sabor [2]. Os frutos desempenham um papel importante na alimentação humana, sendo uma fonte de minerais, vitaminas e fibras para além de hidratos de carbono e proteínas, são importantes para a digestão humana e o seu consumo está associado à prevenção de doenças como o cancro, a diabetes e a obesidade [3].

A parte comestível dos frutos é constituída maioritariamente por parênquima, um tecido não especializado [4]. As células do parênquima são constituídas por um ou mais vacúolos, citoplasma, membrana plasmática, parede celular e a lamela média. Normalmente contêm apenas um vacúolo grande que ocupa a maior parte da célula. A membrana plasmática tem uma natureza semipermeável o que torna a osmose possível. A parede celular, que confere rigidez à célula, pode ser dividida em duas camadas diferentes dependendo do tipo de células, a parede celular primária e a parede celular secundária. A parede celular primária é fina e flexível. A parede celular primária das células do parênquima é composta por uma matriz de polissacarídeos, nomeadamente, celulose, hemiceluloses e polissacarídeos pécnicos, cada um deles responsável por diferentes funções estruturais e fisiológicas [5]. A parede celular secundária é formada após o crescimento e apenas ocorre em algumas células, contém lenhina o que a torna mais rígida e impermeável. A lamela média encontra-se no exterior da parede celular, é responsável por manter as células agregadas e é maioritariamente composta por polissacarídeos pécnicos [6].

Os frutos podem ser consumidos após processamento, com o objetivo de assegurar redução ou inativação de microrganismos e assim aumentar o seu tempo de vida. Contudo, o processamento altera normalmente as suas características organolépticas [7]. Atualmente existem diferentes tipos de processamento, normalmente por tratamentos térmicos, mas ultimamente também por altas pressões ou por irradiação [6].

Os principais métodos de processamento dos frutos são tratamentos térmicos, a temperaturas iguais ou superiores a 90°C, ou congelamento a -18°C. O processamento térmico resulta numa perda de firmeza por parte do alimento. A perda inicial de firmeza é devida à rutura da membrana celular que resulta numa perda de pressão de turgescência [8]. Posteriormente ocorre uma solubilização e despolimerização dos polissacarídeos pécnicos que estão envolvidas na adesão entre as células [9].

Durante a congelação de frutos há formação de cristais de gelo que vão danificar a parede celular de forma irreversível. A formação de cristais de gelo começa inicialmente no espaço intercelular, uma vez que este tem um ponto de fusão superior [10]. A membrana celular atua como uma barreira física impedindo a formação de cristais de gelo no espaço intracelular [11]. Deste modo é criado um desequilíbrio entre o potencial químico da água da solução intracelular com a solução parcialmente congelada extracelular. Assim, normalmente um congelamento lento vai provocar uma maior desidratação das células e formação de cristais de gelo maiores na parte extracelular. Este facto vai causar uma maior separação das células ou mesmo rutura. Por outro lado, um congelamento rápido vai proporcionar uma baixa desidratação das células [12].

Atualmente continua a ser um desafio conservar os frutos durante longos períodos de tempo sem que os produtos percam as características de alimentos frescos [6]. O principal conceito para novos tipos de processamento é o “minimal food processing” que pretende combinar uma segurança microbiológica com pouca alteração na qualidade. A otimização do processamento pode ser feita de dois modos diferentes, ou puramente tecnológica, com ação direta na otimização do processo, ou através de alterações de propriedades intrínsecas da própria planta de forma a ser menos suscetível às alterações [6].

1.1 *Morango*

O morango é um fruto produzido a nível mundial e que é muito apreciado pelas suas características de aroma, cor encarnado vivo, sumarento e doce e é um dos frutos mais populares principalmente no verão. Normalmente são considerados como uma agradável experiência para o paladar [13]. O morango é consumido maioritariamente fresco, cerca de 80% do consumo total, mas também em preparados como sumo, tartes, gelados, iogurtes e batidos.

Após a colheita, uma rápida refrigeração (0°C) e uma humidade relativa entre 90-95% são os fatores mais importantes para impedir alterações na sua qualidade [14]. Os morangos têm um tempo de armazenamento curto devido à sua alta perecibilidade e são sensíveis a danos mecânicos, deterioração fisiológica e perda de água [15]. A rápida perda de firmeza e o amadurecimento rápido são as principais razões para a sua curto tempo de vida. Assim, um melhoramento nestes dois aspetos pode ser um fator importante a nível comercial [16].

A perda de firmeza do morango ocorre principalmente devido à degradação da lamela média sendo que as principais alterações na estrutura da parede celular ocorrem nos polissacarídeos pécticos. O morango tem uma baixa atividade de poligalacturonase, por outro lado, a presença de pectina liase contribuí para a degradação das homogalacturonanas [16]. Um modo de melhorar a textura é pelo reforço da lamela média, que permite que as células do parênquima se mantenham unidas. Esse reforço é possível obter principalmente através de uma ligação iónica entre um catião bivalente com dois grupos carboxílicos livres dos polissacarídeos pécticos [17].

1.2 Polissacarídeos pécticos

Os polissacarídeos podem ser divididos em 4 tipos principais: homogalacturonanas (HG), ramnogalacturonanas do tipo I (RH-I), ramnogalacturonanas do tipo II (RG-II) e xilogalacturonanas (XGA) [18] (figura 1).

As HG são formadas por uma cadeia principal totalmente composta por resíduos de ácido galacturónico (GalA), entre 72-100. Os resíduos de GalA encontram-se parcialmente metilesterificados. As HG têm carga negativa sendo essa carga negativa tanto maior quanto maior for o pH do meio e menor o grau de esterificação [19]. Muitos destes resíduos podem também estar acetilados em O-3 ou O-2. As HG representam cerca de 60% de todos os polissacarídeos pécticos, sendo portanto os mais abundantes.

As RG-I representam entre 20-35% dos polissacarídeos pécticos [20]. São constituídas por cadeias principais compostas por unidades dissacarídicas formadas por um resíduo de ácido galacturónico e um resíduo de ramnose ($[-\alpha\text{-D-GalA-1,2-}\alpha\text{-L-Rha-1-4-]_n$). Estes polissacarídeos são ramificados, normalmente no O-4 da ramnose por polissacarídeos compostos por resíduos ricos em arabinose, galactose, designados por arabinanas, galactanas e arabinogalactanas [21], [22].

Os polissacarídeos pécticos com maior diversidade de açúcares diferentes na sua composição são as RG-II [23]. Tem cadeias ramificadas que contêm 12 tipos diferentes de

enzimática através da ação da poligalacturonase (PG). A β -eliminação nas HG é uma reação onde há perda de um grupo hidroxilo do carbono 4 de um resíduo de GalA na forma de água, havendo quebra de uma ligação glicosídica e formação de um resíduo de ácido galacturónico insaturado no carbono 4 e 5 com formação de uma dupla ligação. A figura 3 mostra as diferentes reações que podem ocorrer em HG [6].

Em soluções ácidas e baixas temperaturas, a reação principal que ocorre nas HG é a desesterificação contudo para temperaturas mais elevadas ocorrem reações de despolimerização.

A despolimerização das HG em soluções alcalinas ocorre devido à β -eliminação contudo apenas ocorre em ligações nas quais o ácido galacturónico está esterificado [26]. Assim o grau de esterificação influencia a degradação térmica das HG quando em solução com pH superior a 4,5 [5]. Para pH inferior a 3 ocorre a hidrólise ácida das HG. Neste caso a despolimerização vai ocorrer com maior frequência quanto menor for o grau de esterificação [27]. Uma vez que o pH da parede celular se encontra geralmente entre 4 e 6 pode-se assumir que a hidrólise ácida é praticamente nula em relação à β -eliminação. A quantidade e o tipo de iões e sais presentes nas plantas influenciam a degradação térmica das HG assim como a firmeza dos tecidos [28].

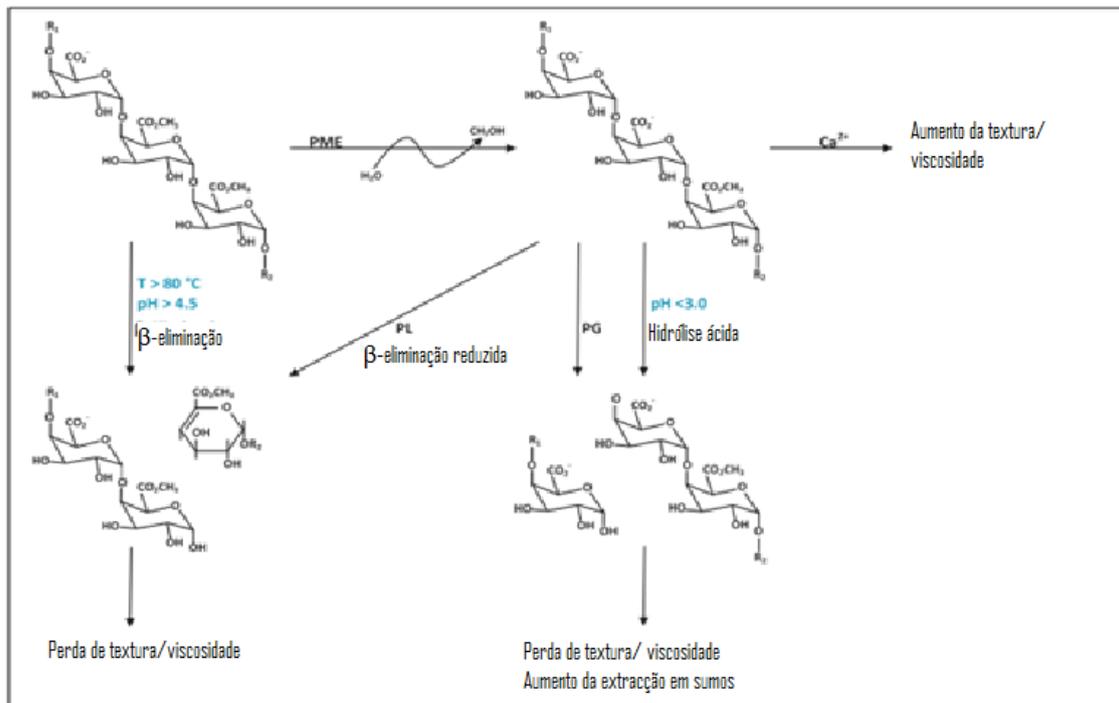


Figura 2 principais alterações que ocorrem em HG e o seu resultado em termos de textura, adaptado de [6]

libertação de metanol e protões [35]. O facto das PME's estarem presentes em todas as espécies de plantas revela a sua importância biológica e tecnológica [36]. Pertence ao grupo das pectinases que têm como função degradar homogalacturonanas presentes nas células vegetais. As principais pectinases são a pectina metilesterase (PME), a poligalacturonase (PG) e a pectina liase (PL). A sua primeira aplicação comercial remonta a 1930, tendo sido aplicadas em vinhos e sumos de frutas. Nos dias de hoje, as pectinases são das enzimas mais importantes em termos comerciais [37]. A maioria das pectinases utilizadas industrialmente tem uma origem fúngica, principalmente no *Aspergillus niger*, são parte integral de sumos de fruta e na indústria têxtil [37].

1.3.1 Propriedades e polimorfismo

A PME foi identificada em todas as plantas superiores, tanto em frutos como em folhas, em flores, em sementes e em raízes [38-39]. Nas plantas, a PME está principalmente associada com a parede celular através de ligações iónicas, assim a sua extração pode ser feita através de soluções com alta força iónica ou aumento o pH de forma a tornar-se mais alcalino [39]. As PME são também produzidas por bactérias e fungos, normalmente fitopatogénicos, [40-42], assim como em microrganismos simbióticos com as plantas [43] e em algumas leveduras [44] e insetos [45]-[46].

A PME tem diferentes isoformas dependendo da sua origem. Todas as PME catalisam para a mesma reação [47] contudo podem diferir no ponto isoelétrico (desde alcalino a ácido), grau de glicolização da enzima, estabilidade térmica, pH ótimo, a dependência em iões ou o padrão de desesterificação [36], [39].

O grande número de isoformas da PME indica uma diversidade no seu papel na modificação da parede celular [48] sendo também um mecanismo para a planta regular a atividade da PME endógena [49].

1.3.2 Propriedades físico-químicas

As PME são enzimas com uma massa molecular média que varia entre 25-54 kDa, são ativas como monómeros [50-51]. O seu ponto isoelétrico varia desde 3,1 para PME de origem fúngica até 11 no caso do tomate [39]. A maioria das PME's das plantas apresenta um pH alcalino ou neutro explicando a sua associação com a parede celular que é ligeiramente ácida. As PME's de origem bacteriana ou fúngica apresentam um pI mais ácido. As PME's mostram ser bastante sensíveis à força iónica e ao pH [51], a sua

atividade aumenta até um valor ótimo com o aumento da concentração de cátions, após atingir o valor máximo a atividade começa a descer [52].

As PME são normalmente termolábeis sendo inativadas a temperaturas superiores a 70°C. A sua estabilidade térmica depende também do ambiente onde está inserida, sistema tampão, sumo ou tecido por exemplo [53]. Uma PME é menos suscetível ao aquecimento quando está inserida num tecido, assim como a adição de açúcares ou polióis aumenta a estabilidade das PME [54]-[55]. Ao contrário do que se sucede com a temperatura, as PME são tolerantes à pressão [56-57].

É possível através da pressão e da temperatura inativar a PME ou a poligalacturonase (PG). O uso de alta pressão mostra características únicas em relação à atividade e estabilidade das enzimas sendo que o seu mecanismo não é totalmente conhecido. Esta tecnologia poderá permitir o desenvolvimento de novos produtos na área alimentar [36].

1.3.3 Atividade catalítica

A PME catalisa de forma específica a ligação metil-éster entre o C-6 de resíduos de ácido galacturónico, deste modo fica um grupo carboxílico livre e há libertação de metanol (figura 4). É necessária a presença de grupos carboxílicos livres perto do centro ativo para que a PME possa atuar [51], [58] explicando assim a preferência das PME's por HG parcialmente desesterificadas [58]-[59].

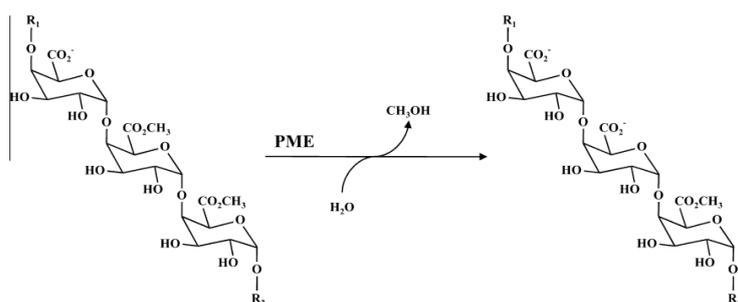


Figura 4 Reação de catalisação da PME

As PME's são muito sensíveis ao ambiente iónico onde estão inseridas. PME com um pI alcalino estão pouco ativas quando inseridas num ambiente ácido devido as interações a enzima carregada positivamente e os grupos carboxílicos livres da HG que resultam da atividade enzimática. A pH básico ocorre o oposto, há uma repulsão

eletrostática entre a enzima e os grupos carboxílicos livres [51], [60]. Os catiões afetam a atividade catalítica sendo que nas PME de plantas são mesmo essenciais [51], [61]. A atividade da PME aumenta até uma certa concentração de sais, a partir do qual há um decréscimo de atividade enzimática [62] sendo que a concentração ótima vai depender do tipo de catião [63-64].

A desesterificação enzimática ocorre de uma forma mais ordenada enquanto a desesterificação não enzimática é um processo aleatório [65]. Foram descritos 3 tipos de mecanismos de ação:

- cadeia única em que a PME desesterifica todos os grupos metilo de uma cadeia de HG antes de passar para a cadeia seguinte;
- Em várias cadeias, em que ocorre apenas uma reação catalítica passando posteriormente para outra cadeia;
- Mecanismo com múltiplos ataques em que a PME remove um número limitado de ésteres de metilo antes de se dissociar da cadeia [58], [66].

Há evidências que as PME's com um pI alcalino clivam a ligação éster de forma sequencial, em bloco, criando desse modo uma longa sequência contínua de resíduos de ácido galacturónico desesterificados. Esse modo de ação é explicado pelos mecanismos de cadeia única e pelo mecanismo com múltiplos ataques [58], [67], [68]. A ligação preferencial a resíduos esterificados realiza-se a montante do sítio catalítico e de resíduos esterificados a jusante suportam este padrão de desesterificação sequencial [58]. As PME's com um pI ácido têm um padrão de desesterificação mais aleatório, possivelmente de acordo com o mecanismo de ataque a cadeias múltiplas [59], [65], [67]. Contudo há outros fatores influenciam o padrão de desesterificação como o pH, grau de esterificação inicial da HG, peso molecular assim como também depende da isoforma da enzima [69]. O modo de ação das PME é do interesse tanto para investigações na área da parede celular das células vegetais assim como para a indústria alimentar pois está relacionada com a suscetibilidade que a HG tem para que ocorra despolimerização enzimática por parte de PG e de PL assim como a formação de géis de cálcio [70].

1.3.4 Função da PME in vivo

As HG, sendo um dos componentes principais dos polissacarídeos pécticos, contribui para a rigidez assim como a adesão das células [71-72]. A PME endógena das plantas está envolvida no metabolismo da parede celular, fazendo parte de processos importantes na fisiologia da planta, tanto associados ao desenvolvimento vegetativo assim

como ao reprodutivo [48], [73], está envolvida na extensão da parede, assim como o seu enrijecimento [61], [74]. A PME desempenha também funções no amadurecimento dos frutos [75]-[76], alongamento do pecíolo [77], crescimento de folhas [78], germinação das sementes [79].

A PME está também associada ao mecanismo de defesa da planta a agentes bióticos (alguns insetos e herbívoros) como a agentes abióticos como por exemplo o frio, stress. Atua tanto de forma direta, atuando nas proteínas de vírus por exemplo [80]-[81] ou de forma indireta através dos produtos da sua reação (metanol, protões e oligossacarídeos) [82]-[83]. Foi também demonstrado um papel no silenciamento de genes [84] assim como na inibição da tradução de DNA inativando os ribossomas [85].

Muitas das funções da PME são facilmente explicáveis, a formação de ligações entre as HG e cálcio formando géis explica o enrijecimento da parede assim como a sua porosidade [70], por outro lado a desesterificação das HG torna-as mais suscetíveis à despolimerização por parte da PG, explicando o amolecimento da parede [86],[87].

Alguns fungos e bactérias, devido à necessidade de degradarem as HG da parede celular sintetizam PME [51], [88].

1.3.5 Relação entre a PME e a PG e a PL

A poligalacturonase (PG) é uma enzima que hidrolisa a ligação α -1,4 formada entre 2 resíduos de ácido galacturónico presentes na HG. Apenas hidrolisa ligações entre resíduos desesterificados, mostrando uma diminuição de atividade com o aumento do grau de esterificação. Tendo em conta que as HG presentes nos frutos têm um elevado grau de esterificação, a atividade da PG nos frutos está dependente da desesterificação efetuada pela PME [36]. Assim como a PME, a PG está presente em diferentes isoformas, tanto na estrutura como na massa molecular, variando desde 23,2 até 120 kDa [36]. Têm um pH básico que indica que interage de forma hidrostática com as HG na parede celular. A sua atividade é suscetível ao ambiente iónico em que está inserida e o pH ótimo depende da origem variando normalmente entre os 4 e os 6 [36] sendo que a sua atividade pode ser negligenciada para valores de pH inferiores a 3,5. A quantidade de PG presente está diretamente relacionada com a degradação da HG nos frutos e conseqüente amolecimento o que leva a crer que a atividade da PG é um dos fatores principais para o amolecimento durante o amadurecimento dos frutos [36]. Tanto a estabilidade como a sua atividade têm uma enorme importância no processamento de um produto, dependendo do objetivo é possível prevenir a perda de firmeza e viscosidade ou aumentar a extração de sumo ou uma

melhor clarificação de sumos [36]. As diferenças na estabilidade térmica em diferentes frutos estão demonstradas na tabela 1.

Tabela 1 Estabilidade térmica da poligalacturonase de diferentes plantas, adaptado de [38]

Fonte	Isoforma	Perda de atividade (%)	T (°C) durante 5 min
Abacate	PG1	80	65
	PG2	90	65
Banana	PG1	100	60
	PG2	100	70
	PG3	40	60
Manga	PG1	65	65
	PG2	100	60
	PG3	40	60
Tomate	Extrato	20 a 50	65
	PG1	5 a 15	65
	PG2	100	65

As pectinas liases, ao contrário das PG, degradam as HG diretamente por β -eliminação que resulta na formação de resíduos de ácido galacturónico insaturados no carbono 4 e 5 formando-se aí uma dupla ligação [89]. É uma enzima com um grande potencial para uso em biotecnologia uma vez que degrada a HG sem alterar o grupo éster, sendo que o grupo éster é responsável por parte do aroma e do sabor e também não há libertação de metanol o que acontece quando se utiliza a combinação de PME com PG. Ao contrário da PG, a PL pode atuar em HG com elevado grau de esterificação, que é a forma como geralmente estão presentes nos frutos.

1.3.6 Importância da PME na indústria

A PME é uma das enzimas mais importantes ao nível de processamento de vegetais e frutos. Por um lado, a presença de enzima endógena pode influenciar de forma positiva ou negativa influenciando na viscosidade, textura, clarificação no caso dos sumos. Por outro lado, a PME exógena tem aplicações na ajuda do processamento.

O método mais conveniente e direto para obter as alterações desejadas nas HG é através da inativação das enzimas indesejadas e o aumento das enzimas com uma funcionalidade importante. Através de um controlo das condições do processo é possível controlar a atividade e a estabilidade das diferentes enzimas de forma a obter as qualidades reológicas e de textura desejada [6].

1.4 Textura

A textura é uma propriedade sensorial com múltiplos parâmetros; viscosidade, elasticidade, dureza, etc. [90-91] que é avaliada essencialmente pela experiência humana. Está relacionada com uma série de variáveis como a composição física e química do alimento e as alterações que se verificam quando ele é sujeito a stresses ou a deformação [13].

1.4.1 Importância da textura na indústria alimentar

Os frutos, por norma, são consumidos na sua forma natural, estando a sua textura relacionada com a textura das células vivas. Essas características são modificadas com os processos fisiológicos e bioquímicos durante o armazenamento, amadurecimento e posteriormente o processamento [90].

A qualidade de um certo produto é determinada por diversos fatores e são esses fatores que vão definir a aceitação por parte do consumidor [92]. A textura dos alimentos é um dos fatores mais importantes que determinam a aceitação do produto por parte do consumidor, podendo ser um aspeto limitante de aceitação no caso de ser muito diferente daquilo que o consumidor espera [93].

1.4.2 Medição da textura

São utilizados métodos instrumentais e sensoriais para medir a textura [90]. Várias tentativas foram feitas de modo a tentar obter um método de análise capaz de traduzir todos os acontecimentos que ocorrem dentro da nossa boca quando ingerimos um pedaço

de um alimento. Os métodos instrumentais desempenham um papel importante pois estão estatisticamente relacionados com a percepção humana [92]. Em termos instrumentais é apenas possível definir certos parâmetros físicos que poderão ser depois associados a diferentes propriedades da textura [90]. Algumas características estruturais são medidas de forma bastante direta, como por exemplo a dureza, firmeza, moleza, podem ser medidos facilmente através de uma força compressiva. Outros parâmetros como a cremosidade e a suculência são mais complexos para avaliar através de métodos instrumentais [90]. As formas instrumentais para medir a textura podem ser divididas em 3 formas: testes empíricos, imitativos e testes fundamentais. Os testes empíricos são baseados em experimentação e observação, sendo assim pouco rigorosos em termos científicos, contudo têm a sua importância e continuam a ser usados em muitas áreas da indústria alimentar. Os testes imitativos têm como objetivo aproximar o processo de mastigação a uma máquina [90]. Os testes fundamentais medem propriedades físicas dos diferentes materiais. Estes testes têm um maior rigor científico e são expressos em unidades científicas bem definidas, permitindo fazer uma comparação entre diferentes produtos [90].

Em termos sensoriais a textura é maioritariamente avaliada na boca mas ao contrário de outras propriedades sensoriais, não possui recetores específicos uma vez que é uma característica com diferentes parâmetros. A utilidade dos métodos sensoriais depende do quão bem eles descrevem as propriedades sensoriais. Através de uma análise sensorial é possível caracterizar a textura com diversos descritores sendo que cada descritor tem uma maior ou menor importância dependendo do alimento a ser analisado. A tabela 2 mostra diferentes parâmetros a ter em conta na avaliação da textura em frutos.

Tabela 2 Principais descritores utilizados para alimentos vegetais, adaptado de [41]

Descritores	Definição	Limite inferior	Limite superior
Firmeza	Força necessária para comprimir um sólido através dos dentes molares	Mole	Duro
Crocaticidade	O ruído produzido pela substância quando é mastigada rapidamente pelos dentes molares	Pouco crocante	Muito crocante
Frescura	Quantidade de som e resistência produzida pelo produto na primeira dentada com os dentes da frente incisivos.	Pouco	Muito
Facilidade de deglutição	Quantidade de ciclos de mastigação necessários até que a amostra possa ser engolida.	Fácil	Difícil
Fibrosidade	Quantidade de filamentos possíveis de distinguir durante a mastigação	Ausência de fibras	Muitas fibras
Presença de sementes	de pequenas partículas distinguidas durante a mastigação	Nenhuma/Poucas	Muitas
Suculência	Quantidade de sumo libertada durante a mastigação	Seco	Sumarento
Capacidade de derreter	O grau com que a amostra se desintegra sem recorrer a mastigação	Fácil	Difícil
Coesão	O grau de compressão que a amostra resiste até se romper	Pouco compressível	Muito compressível
Elasticidade	Capacidade da amostra regressar à sua forma inicial após ser comprimido entre os dentes	Pouco elástico	Muito elástico
Adesividade	Força necessária para remover o material que fica pegado na boca, principalmente no palato	Pouco adesivo	Muito adesivo
Fracturabilidade	Força necessária para que a amostra se quebre	Frágil	Resistente

A análise sensorial pode ser efetuada com base na norma ISO-11036 elaborada pela International Organization of Standardization. O método baseia-se na criação de um perfil de textura através de uma classificação sistemática de todos os parâmetros descritivos dos atributos de textura. Segundo a norma ISO utilizada a textura em termos sensoriais pode ser dividida em três tipos de atributos sendo eles atributos mecânicos, geométrico e de superfície. Os atributos mecânicos são aqueles relacionados com as reações do produto ao stress nele infligido. Estes atributos estão divididos em 5 características principais, são elas a dureza, a coesividade, viscosidade, elasticidade e adesividade. A dureza é a força necessária para a deformação do produto e é avaliada através da compressão do produto através dos dentes molares. Os principais adjetivos que qualificam este atributo são “duro” e “mole”. A coesividade está relacionada com o integridade dos pedaços e o grau com que se pode deformar um produto antes de ele se desintegrar. A viscosidade é a propriedade que é caracterizada pela resistência que um fluido tem ao escoamento, descrito normalmente como viscoso ou fluido. A elasticidade é o atributo mecânico que é caracterizado pela capacidade que o alimento tem de regressar à forma inicial após um

certo grau de compressão. Os adjetivos utilizados para descrever a elasticidade são “elástico”, “maleável” e “plástico”. A adesividade é a propriedade que o produto tem em aderir a outro. Para descrever este parâmetro são utilizados termos como “pegajoso” ou “que cola”. Os atributos geométricos estão relacionados com o tamanho, forma e distribuição das partículas no produto. Estão relacionados com a conformação do produto como por exemplo a fibrosidade, a cristalinidade ou a integridade. Os atributos de superfície estão relacionados com a humidade e quantidade de gordura. Estão também relacionados com a forma como esses constituintes são libertados na boca.

O tipo de descritores utilizados depende do tipo de produto que se pretende analisar. Assim, são escolhidos aqueles parâmetros que são perceptíveis de acordo com a sua intensidade e a ordem em que são perceptíveis. A ordem na qual os parâmetros são avaliados é a seguinte: 1º São avaliados os descritores relacionados com a pré-mastigação, normalmente parâmetros geométricos ou de superfície que possam ser avaliados através da visão ou do toque. 2º São avaliados os parâmetros relacionados com a primeira dentada, atributos mecânicos e geométricos. 3º É avaliada a mastigação e posteriormente a fase residual onde são avaliados o grau e o tipo de degradação do produto. 4º A última fase de avaliação prende-se com a deglutição, a sua facilidade ou se há resíduos que permanecem na boca.

2 Materiais e métodos

2.1 Amostra

Os morangos utilizados neste estudo foram o morango IQF (*Individual Quick Frozen*), em cubos de 10*10*10 mm, sempre do mesmo lote.

A amostra de morango fresco utilizada na análise sensorial foi obtida no supermercado local e cortada no momento não sendo sujeita a nenhum tratamento térmico.

2.2 Enzima

Foi utilizada uma pectina metil-esterase com o nome comercial Rapidase FP super fornecida por DSM. A enzima é obtida através de uma estirpe de *Aspergillus niger*. As condições da reação dependeram do tipo de processo. A enzima é ativa entre 10°C e 50°C tendo como temperatura ótima 40°C . O pH da solução em que a enzima pode operar pode variar entre os 3.5 e os 5.5.

2.3 Métodos de enzimação

A incubação com a enzima foi realizada através de 2 métodos diferentes; um em que foi inserida numa solução tampão de ácido cítrico e citrato e outra em que foi adicionada aos morangos por aspersão.

2.3.1 Método de enzimação por imersão

A solução é adicionada numa proporção de 1,0 g de solução por 1,3 g de fruta. Na tabela 3 está indicada a composição da solução tampão.

Tabela 3 Composição da solução tampão adicionada no método de enzimação por imersão

Composto	% (m/m)
Ácido cítrico-citrato	0,1 M
Cloreto de cálcio 1%	1% (m/m)
Enzima rapidase FP super	1% (m/m)

2.3.2 Método de enzimação por aspersão

Foi preparada uma solução (tabela 4) que foi posteriormente aspersa nos pedaços de morango ainda congelados. Foi adicionada 3% de solução em relação à massa de fruta.

Tabela 4 Composição da solução utilizada na enzimação no método por aspersão

Composto	% (m/m)
Cloreto de cálcio	9,4
Enzima rapidase FP super	6,3
Sorbato de potássio	4,8

A solução foi aspersa sobre os pedaços de morango descongelados de forma a controlar melhor o processo e comparar o efeito da enzima a diferentes temperaturas. Contudo num processo industrial a sua aplicação pode ser efetuada com os morangos ainda congelados, não sendo necessário esperar pelo seu descongelamento. Ambos os métodos de enzimação foram realizados em banho-maria com a temperatura controlada.

2.4 Incorporação em preparado e aplicação em iogurte

A incorporação no preparado foi efetuada segundo os procedimentos da Frulact. A fórmula do preparado foi elaborada pela Frulact.

Tabela 5 Composição do preparado de morango utilizado.

Composto	% (m/m)
Água fria	18,26
Solução carmim cochonilha	0,5
Concentrado de puré de morango	1,0
Açúcar	17,25
Morango 10*10*10	60,0
Amido	2,2
Carragenana	0,2
Goma guar	0,16
Citrato trissódico	0,1

O preparado foi aplicado no iogurte numa percentagem de 20% em massa. Foi utilizado iogurte com adição de 8% de açúcar.

2.5 Medição de firmeza

A medição da textura foi efetuada através de um texturómetro, modelo TA-XT2, da marca Stable Micro System, Godalming, Surrey, UK e com uma célula de carga de 50 kg. Foi utilizada como sonda de compressão um prato de 20 cm de diâmetro. Para cada medição foram selecionados 9 pedaços dispostos num quadrado de 3x3, os quais foram comprimidos 5 mm e a força exercida foi registada. Cada medição foi repetida 10 vezes dada a elevada heterogeneidade das amostras de morango.

2.6 Caracterização dos retidos

Os retidos são a quantidade de massa que fica retida após a passagem num crivo. O objetivo da pesagem dos retidos é obter informação em relação à quantidade de pedaços que se obtém após a pasteurização assim como a sua distribuição em termos de tamanho.

A medição de retidos foi efetuada para os preparados assim como para o iogurte com os pedaços. A caracterização dos retidos foi efetuada através da utilização de crivos com 4 tamanhos diferentes de poro. Tendo em conta que os pedaços de morango utilizados foram de 10 mm, o crivo de maior tamanho utilizado foi o crivo de 8 mm. O seguinte foi o crivo de 5 mm onde ficam retidos pedaços mais pequenos mas ainda assim com dimensão perceptível à mastigação. Depois foram selecionados crivos de 2 mm e o de dimensões menores com 1 mm. Nestes 2 últimos crivos apenas ficam retidos pedaços de dimensões muito pequenas sendo que no crivo de 1 mm os retidos não são pedaços íntegros mas sim polpa.

2.7 Análise sensorial para determinação do perfil de textura

A análise sensorial foi efetuada com base na norma ISO-11036 elaborada pela International Organization of Standardization. O método baseia-se na criação de um perfil de textura através de uma classificação sistemática de todos os parâmetros descritivos dos atributos de textura do morango.

Foi escolhido um painel de provadores para um reunião inicial para escolher os descritores necessários avaliar de forma a criar um perfil de textura completo para o morango. Nessa

primeira reunião foram utilizadas amostras de forma a abranger toda a variedade que se pretendia avaliar.

Através desta reunião inicial foram decididos 6 descritores de textura que se consideraram relevantes na criação de um perfil de textura para pedaços de morango. Esses descritores são a firmeza, dureza, crocância, elasticidade, fibrosidade e suculência. A escolha da ordem pela qual os descritores foram avaliados foi escolhida nesta ordem uma vez que é a ordem pela qual se avaliam. A firmeza é uma propriedade relacionada com a primeira dentada, enquanto a dureza está relacionada com as dentadas seguintes. Tanto a crocância como a elasticidade foram avaliadas de forma simultânea. A fibrosidade foi avaliada principalmente no final da mastigação no caso de haver presença de fibras. A suculência, quantidade de sumo libertada ao longo da mastigação, foi a última característica a ser avaliada.

As amostras fornecidas foram padronizadas de forma a serem iguais para todos os provadores havendo contudo diferenças entre os pedaços individuais. Tentou-se que as amostras fornecidas fossem o mais reprodutível possível. As amostras foram fornecidas nas mesmas condições de temperatura, humidade e tempo após a sua preparação. O painel foi composto por 15 provadores. A análise estatística dos dados foi efetuada através de ANOVA e do teste tukey.

Não foram utilizadas escalas com produtos de referência uma vez que as amostras a avaliar são apenas pedaços de morango não fazendo sentido comparar com outros produtos. Assim as escalas utilizadas foram de 150 mm e os produtos foram inseridos em comparação com as restantes amostras.

3 Resultados e discussão

3.1 Otimização de metodologia de enzimagem

Os primeiros estudos efetuados tiveram como objetivo desenvolver o método de enzimagem a utilizar. Aos pedaços de morango descongelados foram imersos numa solução tampão ácido cítrico e citrato a pH 4,5 contendo enzima e cloreto de cálcio, tendo permanecido nesta solução 30 min à temperatura de 40 °C. Como controlo, pedaços de morango foram imersos numa solução de cloreto de cálcio. A firmeza dos morangos foi determinada em frutos que não sofreram estes tratamentos e em frutos tratados (figura 5). Foi possível verificar um aumento de 50% de firmeza dos pedaços de morango com a

utilização da enzima. O tratamento controle não causou um aumento de firmeza dos pedaços de morango confirmando assim a vantagem na adição da enzima.

Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos em [94] onde a adição de PME e cloreto de cálcio em vácuo permitiu obter um aumento significativo da firmeza dos morangos. Foi demonstrado anteriormente que a adicionando apenas cálcio não aumenta a firmeza do morango mas permite um pequeno aumento na massa dos frutos [95]. O aumento de firmeza é explicado pela diminuição do grau de esterificação das HG e formação de pontes de cálcio entre duas cadeias de HG [95].

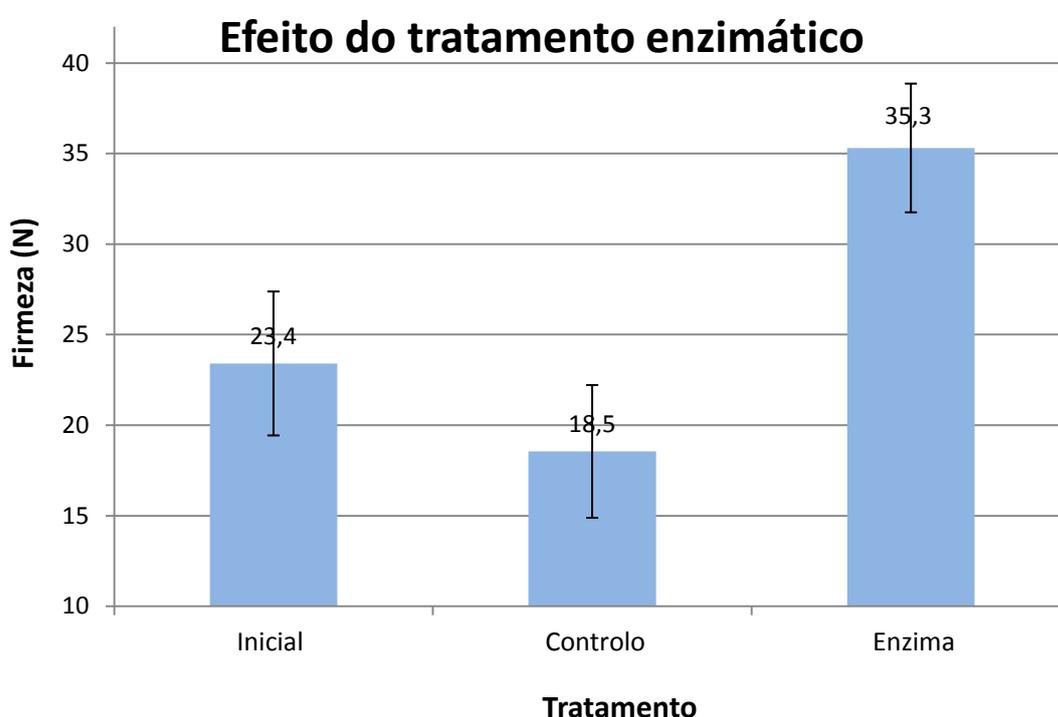


Figura 5 Ensaio preliminares para verificar a atuação da enzima.

3.2 Método de enzimagem por imersão

3.2.1 Influência do pH

Tendo em conta que o pH influencia a atividade enzimática foram realizados ensaios com soluções a diferente pH de forma a estabelecer o pH ótimo para a atividade da enzima. Foi selecionada uma gama de pH próxima do pH fisiológico do morango, próximo de 4,5, e também próximo do pH ótimo da enzima [96]. A figura 6 mostra a variação de firmeza em função do pH na gama 3,4 e 5,0. De acordo com os resultados obtidos

podemos concluir que a variação do pH nesta gama não influencia de forma significativa a firmeza dos pedaços de morango.

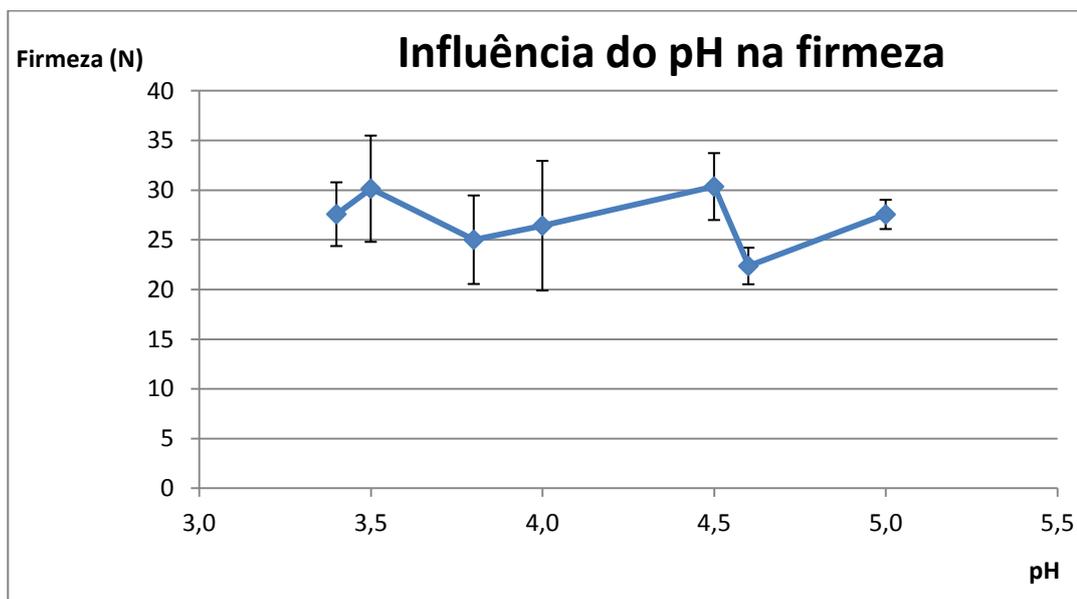


Figura 6 Efeito do pH do tampão na atuação da enzima e na firmeza

3.2.2 *Influência do tempo*

Foi testado a influência do tempo de enzimação na firmeza dos pedaços de morango. O tempo de imersão influencia a firmeza dos pedaços de morango, havendo um incremento de firmeza nos primeiros 15 minutos. Após os 15 minutos de imersão verificou-se uma estabilização da firmeza dos pedaços. Após 70 minutos de enzimação foi atingida uma firmeza de 30,5 N. Foi realizado um ensaio controle em que as condições de incubação foram as mesmas contudo não se adicionou enzima. A firmeza dos pedaços de morango no controle foi sempre inferior à firmeza verificada nos pedaços enzimados (figura 7).

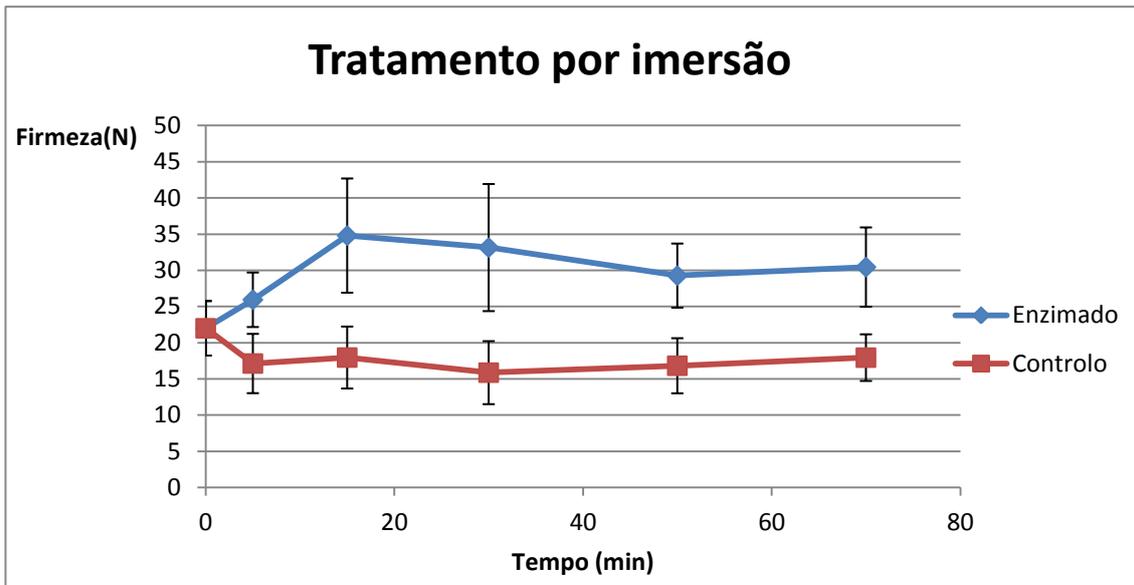


Figura 7 Firmeza em função do tempo para teste a 40°C imerso numa solução tampão

3.3 Método de enzimação por aspersão

3.3.1 Influência do tempo

O segundo método, a enzima foi aspersa nos pedaços de morango sem ser adicionada qualquer solução tampão. Os resultados da medição da firmeza para diferentes tempos de enzimação mostram que existe um aumento de firmeza ao longo do tempo (figura 9). O valor de firmeza obtido mais elevado foi com o tratamento por aspersão durante 70 minutos onde foi possível atingir os 39 N. Estes resultados vão de encontro com resultados obtidos anteriormente onde uso da PME permitiu uma desesterificação 60% de HG totalmente esterificada de maçã ao fim 2 horas, essa desesterificação aumentou para 65% após 4 horas [97].

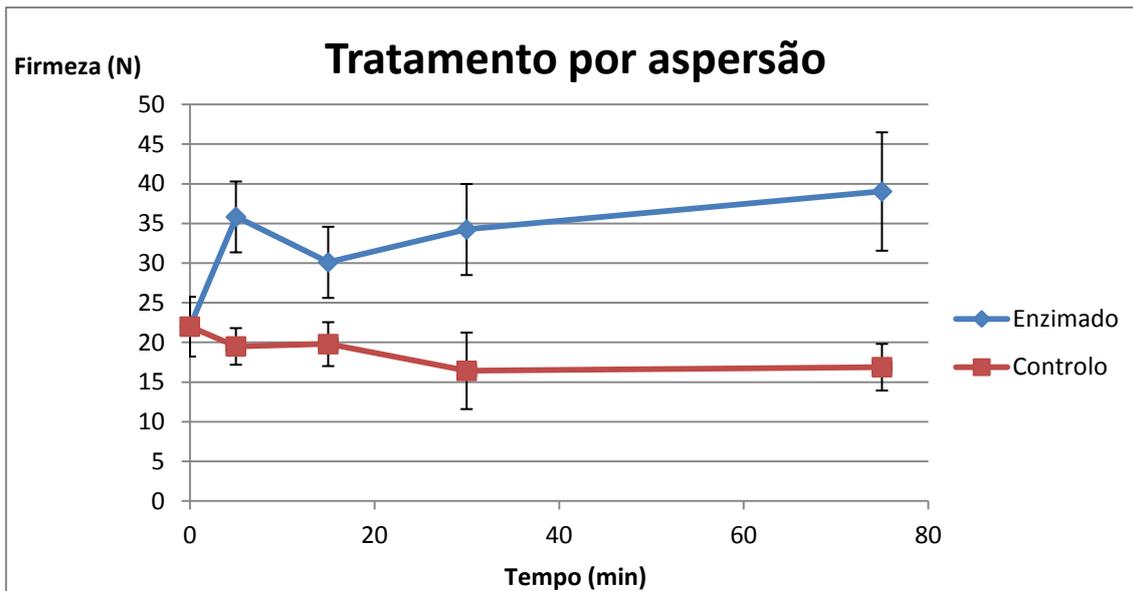


Figura 8 Firmeza em função do tempo para o método de aspersão

3.3.2 Comparação com o método de enzimação por imersão

Ambos os métodos mostram ser semelhantes em termos de resultados, não se tendo verificado diferença entre eles. O tratamento com imersão na solução tampão tem o inconveniente de não permitir a utilização total da fruta utilizada na posterior incorporação no preparado uma vez que é necessário retirar a solução tampão assim como a solução libertada pelos morangos durante a descongelação. O método por aspersão permite que seja utilizada a totalidade da fruta uma vez que é apenas adicionada uma pequena percentagem de enzima, cálcio e água que não influencia na incorporação em preparado. Com base nestes resultados o método utilizado para continuar os estudos foi o método da aspersão da enzima uma vez que evita desperdícios de fruta.

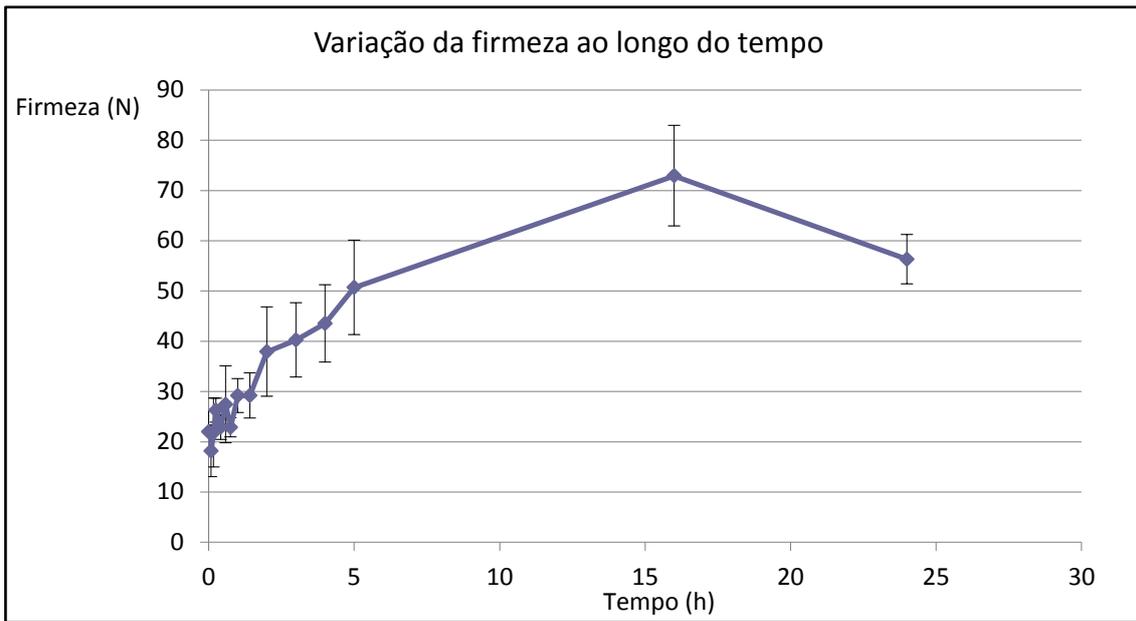
3.4 Influência da temperatura e tempo de enzimação na firmeza do morango

Para estudar a influência da temperatura e do tempo de enzimação na firmeza do morango foram usadas 3 temperaturas diferentes durante o tempo necessário para que a firmeza dos pedaços atingisse o máximo. As temperaturas utilizadas foram: 40°C uma vez que é a temperatura à qual a enzima apresenta atividade máxima; 25°C, temperatura ambiente, uma vez que há atividade enzimática e não é necessário proceder-se a um aquecimento; 4°C, temperatura à qual há uma maior conservação dos morangos. Na figura 10 podemos ver a evolução da firmeza ao longo do tempo para as 3 temperaturas. A 40°C

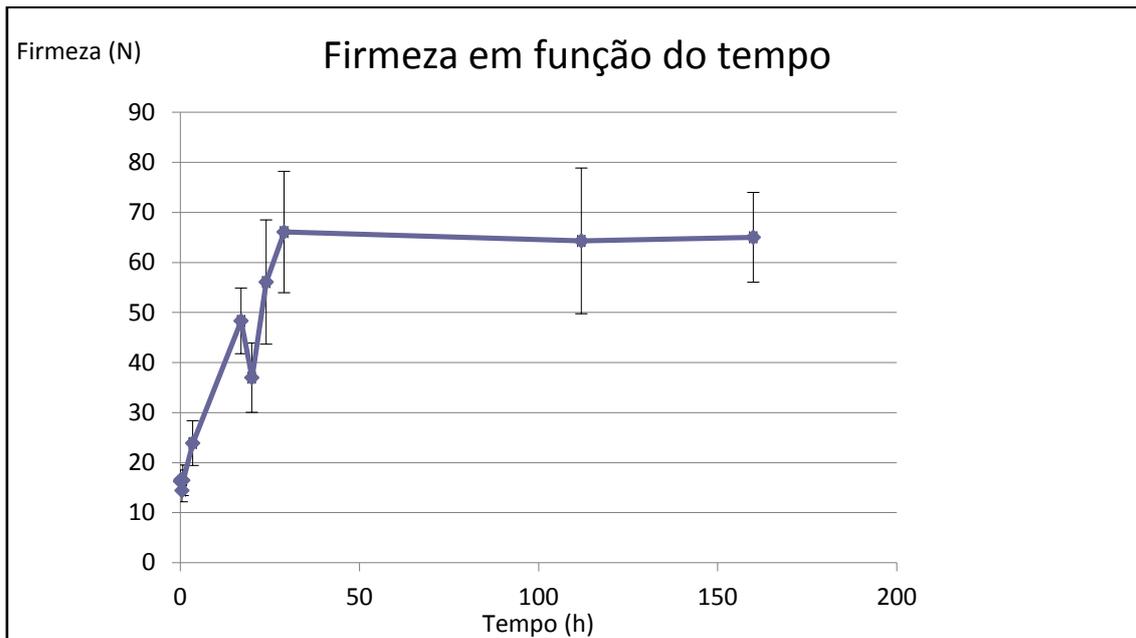
foi possível obter uma firmeza máxima de 73 N, obtida ao fim de 16 horas de enzimação. Após as 16 horas há uma ligeira redução de firmeza (figura 9a). Para a temperatura de 25 °C há um aumento constante da firmeza ao longo do tempo até se atingir a firmeza máxima de 64 N. Após as 24 horas de enzimação é atingido o máximo, mantendo-se a firmeza estável ao longo do tempo mesmo ao fim de uma semana (figura 9b). A firmeza máxima atingida com a temperatura de 4°C foi de 74 N, contudo essa firmeza é apenas atingida após 11 dias de tratamento. A 4°C foi a temperatura que mais tempo necessitou para atingir a firmeza máxima (figura 9c).

Entre as 3 temperaturas utilizadas observa-se um efeito semelhante da enzimação (figura 9). Nos períodos iniciais é verificado um aumento de firmeza mais acentuado. Este aumento sofre um abrandamento até ao momento em que estabiliza atingindo-se assim a firmeza máxima.

a)



b)



c)

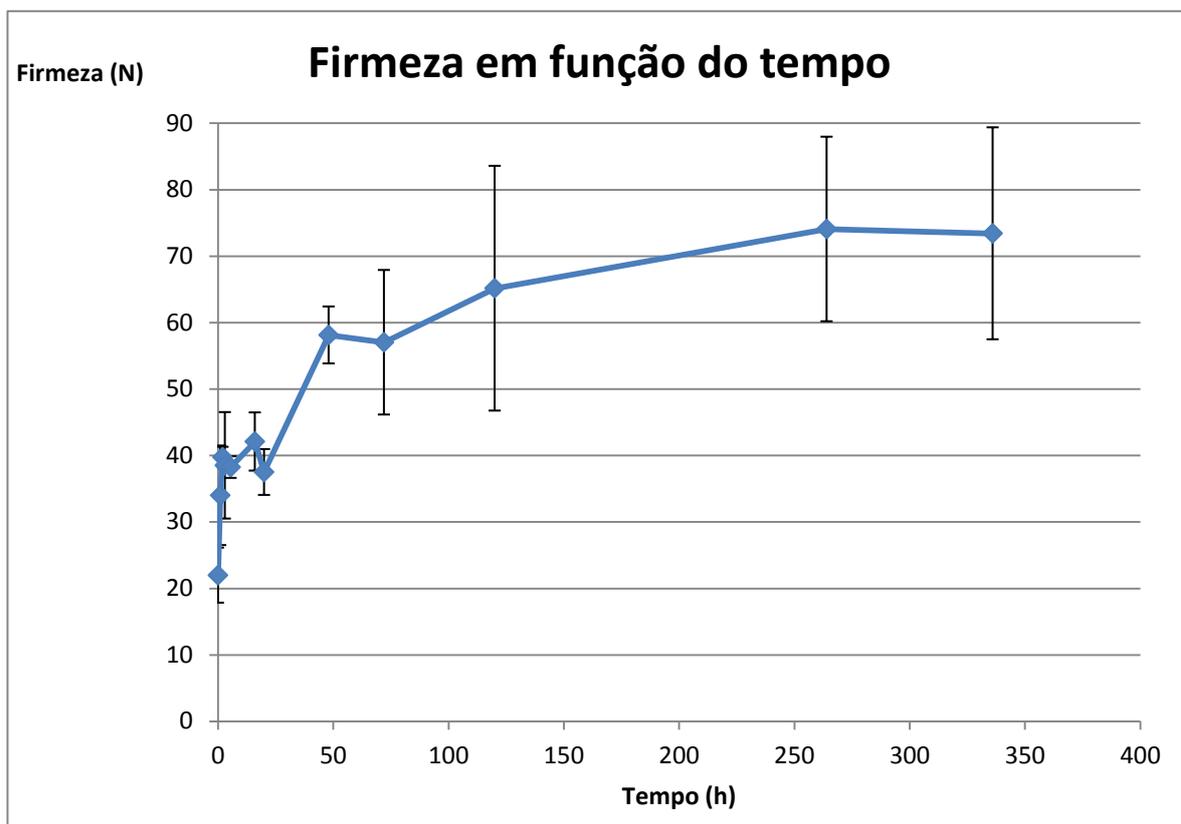


Figura 9 Variação da firmeza ao longo do tempo de enzimação através do método de aspersão a) 40°C b) 25°C c) 4°C

3.4.1 Modelos matemáticos para 4°C, 25°C e 40°C

Os dados obtidos foram adaptados ao modelo matemático one-phase association (equação 1). Onde F (N) é a firmeza dos pedaços de morango, F_0 (N) é a firmeza inicial dos pedaços de morango antes do tratamento enzimático, t (h) é o tempo de enzimação e k (h^{-1}) é a constante de velocidade de enzimação. Este modelo pressupõe a existência de uma assíntota, F_{max} (N), sendo esta o valor da firmeza quando o tempo tende para infinito. Na figura 10 está representada a variação da firmeza ao longo do tempo para as 3 temperaturas e a respetiva adaptação ao modelo matemático.

Equação 1 Equação matemática do modelo one-phase association

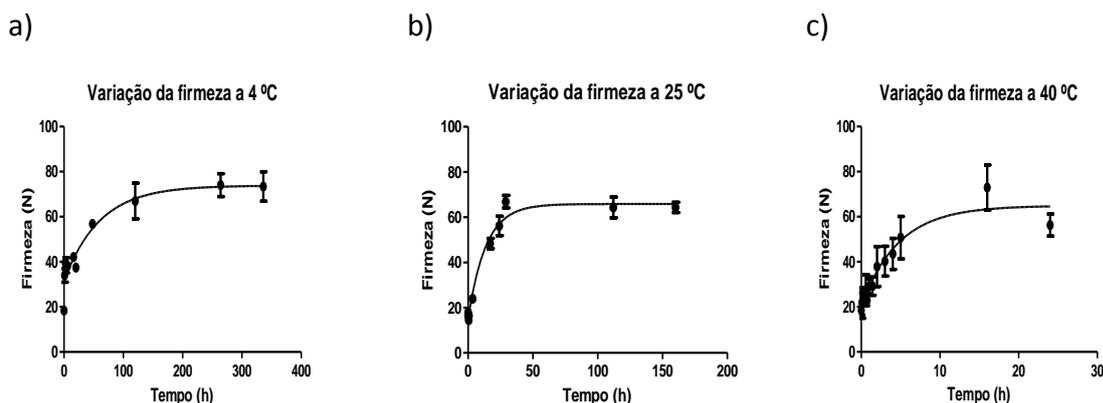


Figura 10 Variação da firmeza ao longo do tempo para as 3 temperaturas utilizadas e a respetiva adaptação ao modelo matemático a) 4°C b) 25°C c) 40°C

Para a temperatura de 4°C o modelo matemático tem um coeficiente de correlação (R^2) de 0,763. De acordo com este modelo, a firmeza máxima obtida é de $73,8 \pm 6,2$ N. A constante de velocidade de enzimação, k , é de $0,016 \text{ h}^{-1}$. Com o tratamento enzimático a 4°C são necessárias 147 horas para que os pedaços de morango atinjam 95% da firmeza máxima. A constante de velocidade de enzimação, k , é muito baixa sendo necessário prolongar o período de tempo para se atingir uma firmeza elevada (equação 2, tabela 6).

Equação 2 Adaptação do modelo matemático para a temperatura de 4°C

Para a temperatura de 25°C o ajuste ao modelo matemático tem um coeficiente de correlação (R^2) mais elevado, 0,917. Neste caso a firmeza máxima obtida é de 65,8 N, mostrando ser inferior à obtida a 4°C. A constante de velocidade da enzima para os 25°C, k , é de $0,073 \text{ h}^{-1}$, isto significa que o aumento de firmeza ocorre a uma velocidade superior. São necessárias 38 horas de enzimação a 25°C para atingir os 95% da firmeza máxima, bastante inferior ao tempo necessário a 4°C (equação 3, tabela 6).

Equação 3 Adaptação do modelo matemático para a temperatura de 25°C

Para temperatura de 40°C o coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,818. A firmeza máxima obtida foi $64,9 \pm 4,6$ N, semelhante à obtida na enzimação a 25°C. A constante de

velocidade de enzimação, $0,209 \pm 0,059 \text{ h}^{-1}$, foi superior do que em qualquer uma das outras temperaturas. Verifica-se então que a 40°C o aumento de firmeza ocorre a uma velocidade superior, sendo o tempo necessário para atingir 95% da firmeza máxima 13 horas (equação 4, tabela 6). O facto da constante velocidade de enzimação ser superior à temperatura de 40°C é explicado por esta ser a temperatura ótima da enzima [96]. É através do tratamento à temperatura de 40°C que há um aumento mais rápido da firmeza sendo a temperatura á qual se atinge a firmeza máxima mais rapidamente. Para o tratamento com temperatura de 4°C podemos verificar que é significativamente mais lento, e que mesmo após 100 horas de enzimação ainda não foi atingida a firmeza máxima (figura 11).

Equação 4 Adaptação do modelo matemático para a temperatura de 40°C

Tabela 6 Representação dos dados cinéticos obtidos através do modelo matemático para as 3 temperaturas utilizadas

Parâmetros	Temperatura		
	4°C	25°C	40°C
F0 (N)	$31,4 \pm 4,0$	$14,8 \pm 3,0$	$20,7 \pm 2,4$
Fmax (N)	$73,8 \pm 6,2$	$65,8 \pm 3,4$	$64,9 \pm 4,6$
k (h^{-1})	$0,0166 \pm$	$0,0730 \pm$	$0,209$
	$0,0086$	$0,0178$	$\pm 0,059$
Half-time (h)	$57,53 \pm 30,03$	$9,498 \pm 3,072$	$3,324 \pm 1,3$
95% da firmeza max (h)	147	38	13
R²	0,763	0,917	0,818

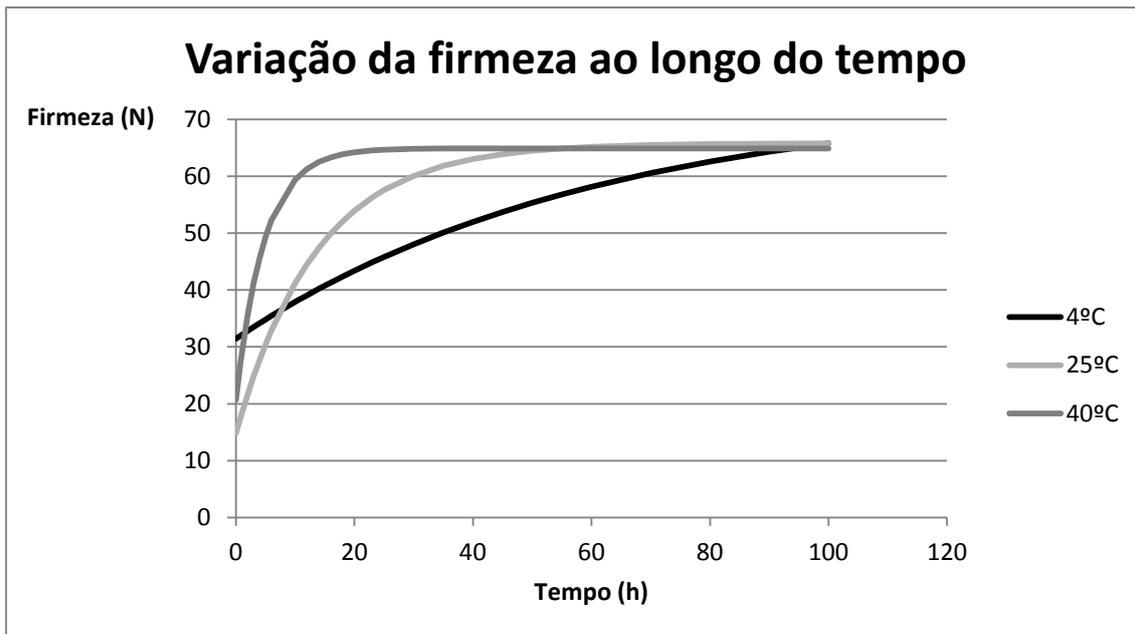


Figura 11 Representação das equações obtidas para as 3 temperaturas utilizadas

3.4.2 Correlação da constante de velocidade de enzima com a temperatura

O valor de k está dependente temperatura utilizada no tratamento enzimático. A equação de Arrhenius permite estabelecer uma relação entre uma constante de velocidade de uma reação com a temperatura (equação 5). Onde, k é a constante de velocidade, A é uma constante pré exponencial que está relacionada com área de contacto, idêntica para as 3 temperaturas uma vez que os morangos eram do mesmo tamanho. E_a é a energia de ativação da enzima, R é a constante dos gases perfeitos e T a temperatura expressa em graus Kelvin.

Equação 5a Equação de Arrhenius

—

Equação 5b Equação de Arrhenius linearizada

— —

Utilizando os dados obtidos através da adaptação ao modelo matemático é possível obter uma reta que relaciona a temperatura utilizada com a constante de velocidade da enzima, k (equação 6a, figura 12). Através da linearização obtida é possível calcular tanto a energia de ativação da enzima, E_a , assim como a constante pré-exponencial, A .

Deste modo a equação de Arrhenius que permite estabelecer uma relação entre a constante de velocidade da enzima, k , com a temperatura utilizada no tratamento enzimático (equação 7). Na figura 13 está representada a equação para o intervalo de temperaturas entre os 4°C e os 40°C uma vez que foi o intervalo ao qual a enzima foi estudada. O aumento de temperatura aumenta a constante de velocidade da enzima no intervalo de temperaturas selecionado.

Através da adaptação do tratamento enzimático a um modelo matemático e a sua correlação entre a temperatura utilizada e a constante de velocidade é possível prever a firmeza dos pedaços de morango para qualquer temperatura no intervalo entre 4°C e os 40°C e tempo de enzimagem.

Equação 6 Relação entre a constante de velocidade de enzimagem com a temperatura linearizada

—

Equação 7 Adaptação da equação de Arrhenius ao modelo matemático

—

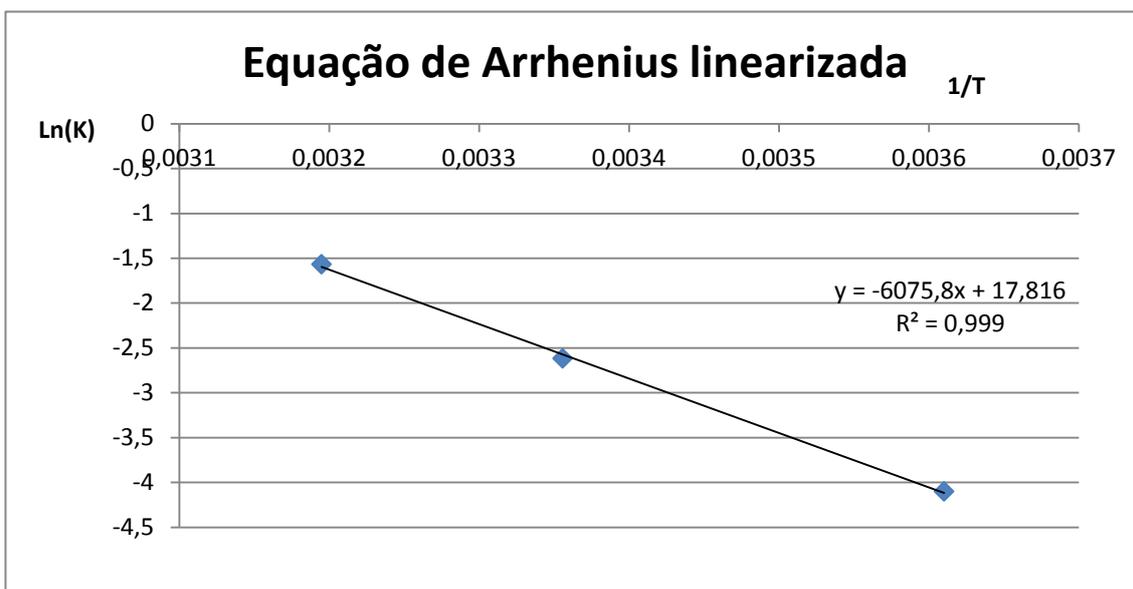


Figura 12 Linearização da equação de Arrhenius e a respetiva equação da reta que melhor se ajusta aos 3 pontos

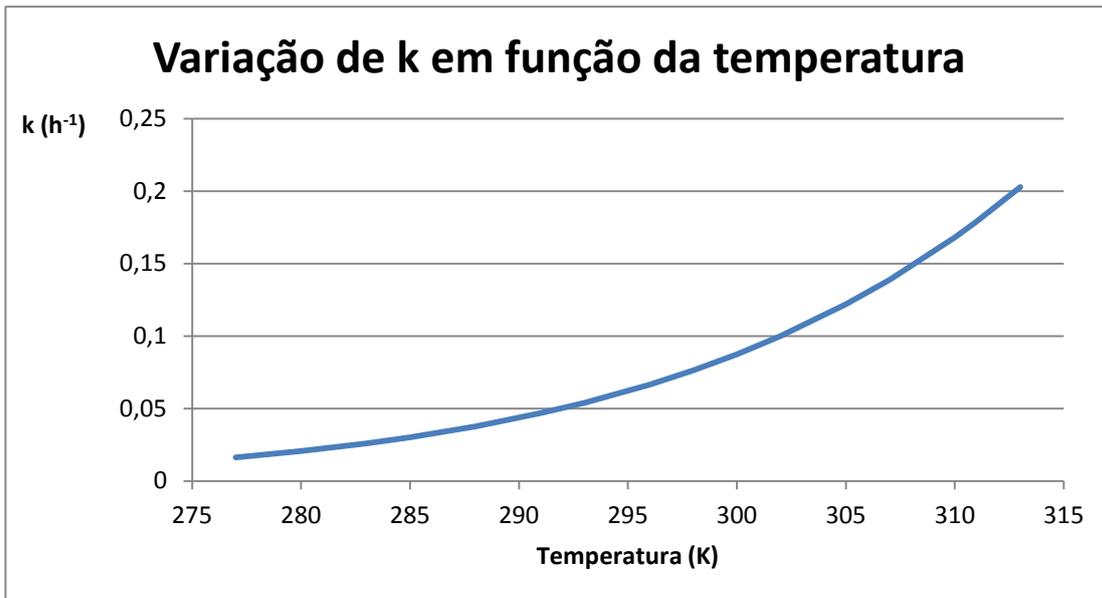


Figura 13 Representação da equação de Arrhenius para mostrar a variação da constante de velocidade de enzimação (k) para o intervalo de temperaturas utilizado.

3.5 Aplicação em preparado

Foram elaborados 4 preparados de pedaços de morango com o objetivo de estudar a variação da sua firmeza assim como os retidos. Os preparados foram elaborados com pedaços de morango com diferentes tratamentos (tabela 7). Inicialmente os pedaços de morango têm uma firmeza de 14,9 N, essa firmeza aumenta com o tratamento enzimático. A incorporação dos pedaços de morango no preparado e a sua pasteurização provoca uma diminuição na sua firmeza. Foi demonstrado anteriormente que o tratamento térmico a 95°C provoca uma diminuição acentuada na firmeza dos morangos [95]. A incorporação em iogurte não alterou a firmeza, mantendo-se a mesma estável. O tratamento enzimático permite obter pedaços de morango com uma firmeza superior à firmeza inicial mesmo após a sua incorporação em iogurte (figura 14).

Tabela 7 Condições do tratamento enzimático dos pedaços em cada preparado

Preparado	Temperatura (°C)	Tempo de tratamento (h)
1	Sem tratamento	Sem tratamento
2	4	24
3	25	6
4	40	1

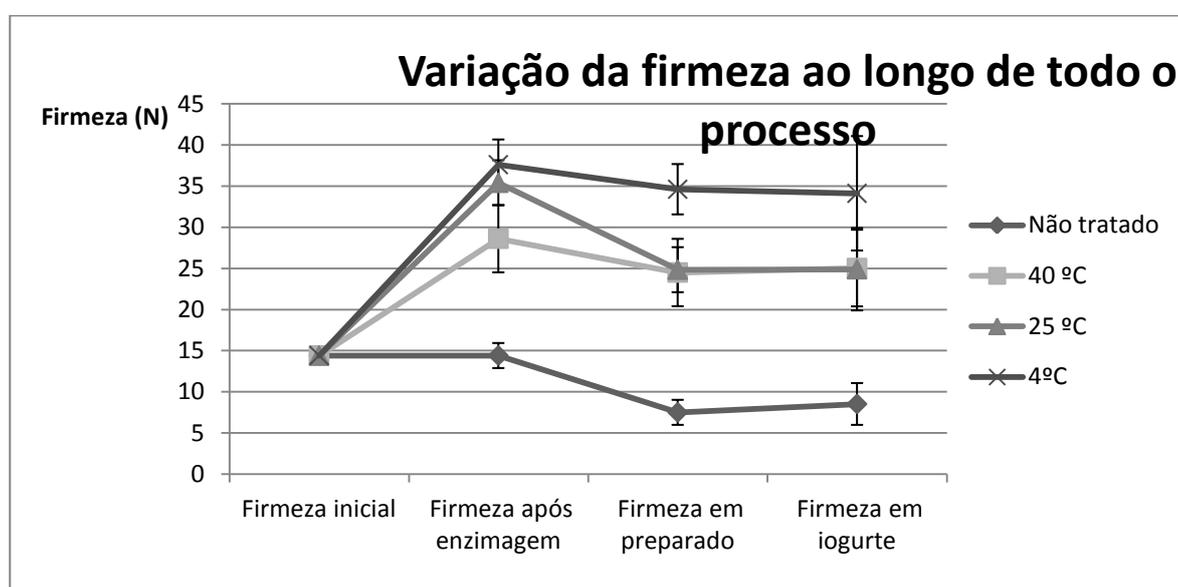


Figura 14 Variação da firmeza ao longo do processamento dos pedaços de morango

Um outro parâmetro com importância na análise do efeito da enzima é a caracterização dos retidos. Foram medidos os retidos para crivos com 8 mm, 5 mm, 2 mm e 1 mm. Foi calculado o rendimento, em termos de massa dos retidos, que foi possível obter após a incorporação no preparado (tabela 8). No caso do preparado sem o tratamento enzimático obteve-se 58% da massa inicial de morango, o uso de enzima permitiu aumentar a massa de retidos nos 3 casos, atingindo-se, a 25°C, 68% da massa inicial de morango.

A figura 15 permite fazer a comparação na distribuição dos tamanhos dos pedaços entre os diferentes preparados. No caso do preparado sem tratamento enzimático 40% dos retidos são inferiores a 5mm. No caso dos preparados com pedaços enzimados a quantidade de retidos superiores a 5 mm é superior a 86% havendo reduzida quantidade de

retidos no crivo de 2 mm e 1 mm. O tipo de distribuição dos retidos para os preparados com tratamento enzimático é diferente, havendo uma maior quantidade de retidos superiores a 5mm. Este facto mostra que a enzima permitiu obter pedaços de morango mais íntegros e que resistem melhor à pasteurização (Figura 15a).

Nos retidos após a aplicação em iogurte é possível verificar as mesmas diferenças entre os pedaços sem tratamento e os pedaços com tratamento enzimático. No caso dos pedaços sujeitos a tratamento enzimático pelo menos 96% tem tamanho superior a 5mm. Nos pedaços de morango sem tratamento enzimático apenas 53% dos retidos têm dimensões superiores a 5 mm (figura 15b).

Podemos verificar que a utilização de enzima permitiu aumentar ligeiramente o rendimento em termos de massa total de retidos. Contudo o principal efeito verifica-se no tipo de retidos obtidos. A utilização da enzima permite obter pedaços de morango com tamanho superior oferecendo assim uma maior perceção dos pedaços.

Tabela 8 Rendimento em massa do morango recuperado nos crivos após incorporação dos pedaços em preparado.

	Rendimento (m/m)(%)
Sem tratamento	58
4°C	62
25°C	68
40°C	61

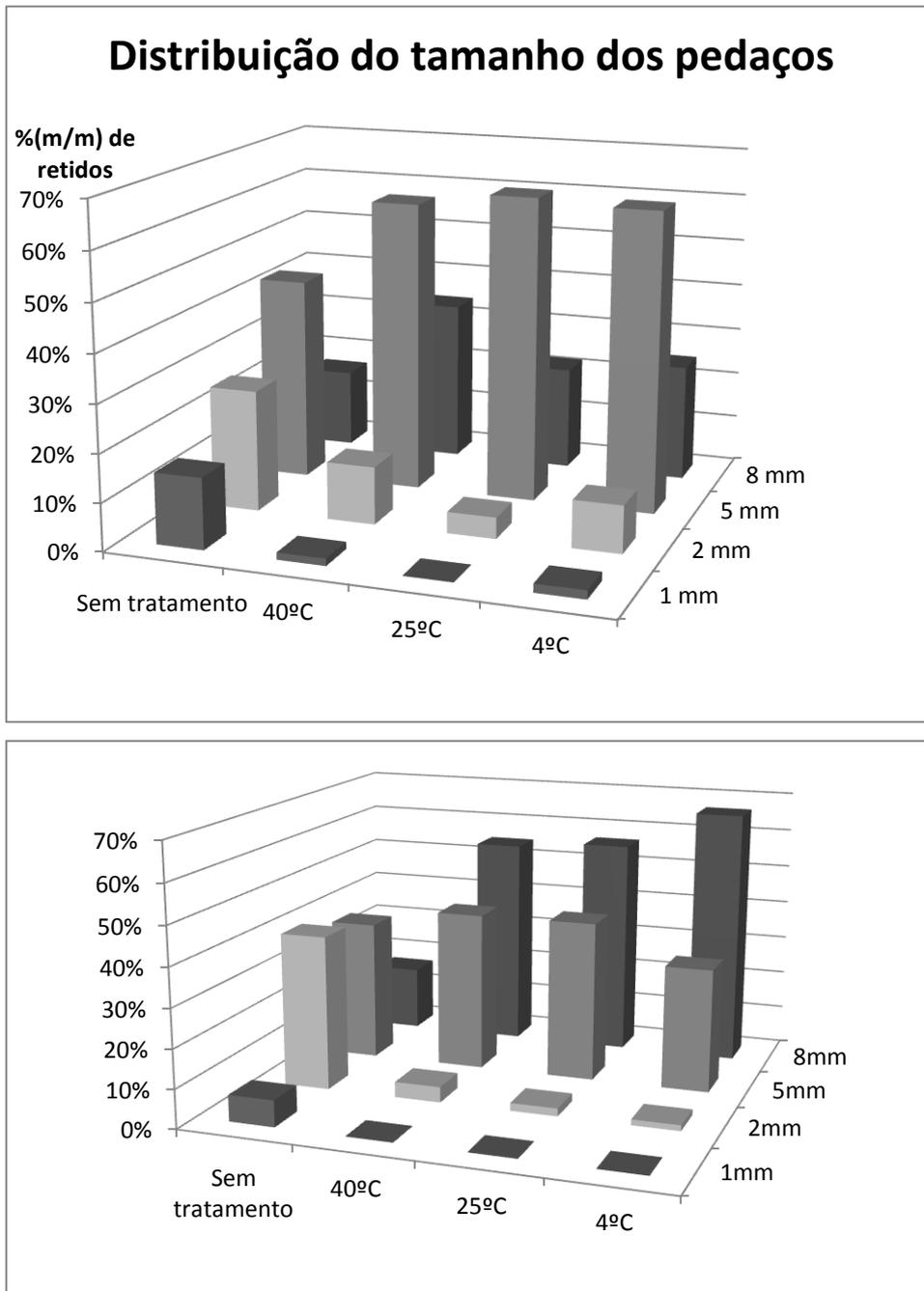


Figura 15 Distribuição em termos de tamanho dos retidos, em % da massa total de retidos a) após a incorporação dos pedaços em preparado b) após a aplicação em iogurtes.

3.6 Análise sensorial

Foi realizada uma análise sensorial tanto aos pedaços de morango como aos pedaços incorporados em preparado e em iogurte. A análise sensorial teve como objetivo verificar o efeito da enzima ao nível da percepção sensorial.

Os primeiros testes de análise sensorial foram realizados diretamente com pedaços morangos por forma a existir uma maior percepção das características dos pedaços. Nesta primeira fase, aos provadores selecionados foram dadas a provar 3 amostras diferentes de pedaços de morango. Uma primeira amostra constituída por pedaços de morango IQF, aquele utilizado atualmente em produção. Uma segunda amostra de pedaços de morango com tratamento enzimático, esta amostra tem como objetivo mostrar as diferenças de textura que ocorrem nos pedaços de morango com a enzimação. Por fim uma amostra de pedaços de morango fresco acabado de cortar, esta amostra foi fornecida com o objetivo de mostrar aos provadores o perfil de textura que se pretende obter com o tratamento enzimático. A escolha dos descritores a utilizar na análise sensorial foi efetuada tendo em conta essas mesmas alterações na textura.

As diferentes amostras apresentam diferentes perfis de textura (figura 16). Podemos verificar que o morango IQF descongelado é aquele que apresenta uma menor firmeza, dureza e crocância. Em termos de suculência o IQF apresenta valores semelhantes ao do morango fresco. O morango enzimado permite obter firmeza e dureza semelhantes ao morango fresco contudo a enzimação aumenta de forma significativa a sua elasticidade. Em termos de fibrosidade não se verificaram diferenças significativas entre as amostras.

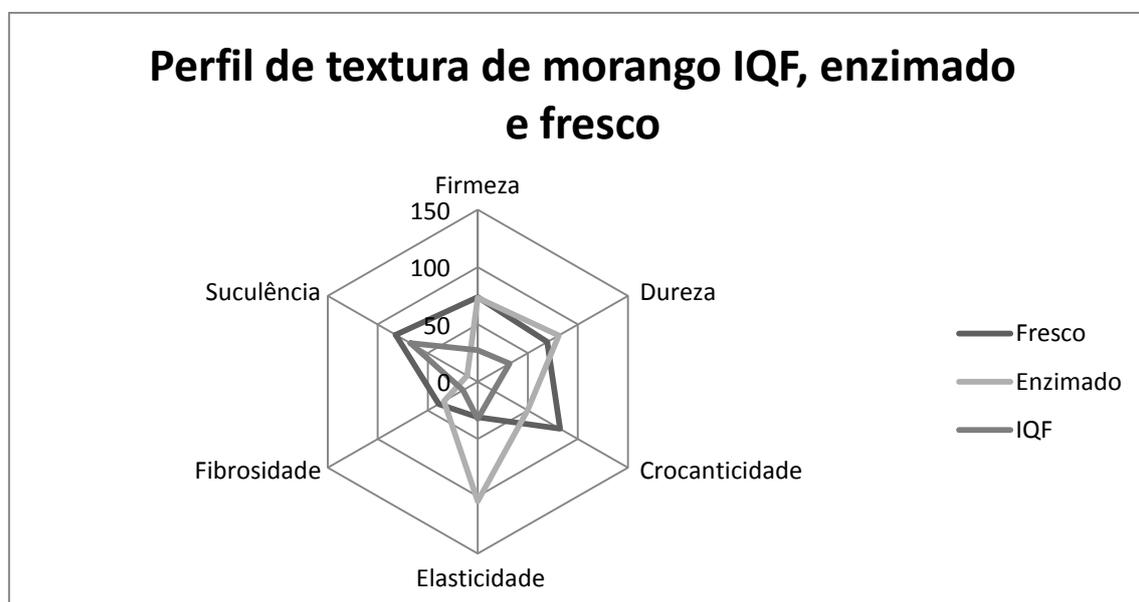


Figura 16 Perfis de textura de pedaços de morango frescos, enzimados e IQF

Numa segunda análise sensorial foi avaliada a influência da temperatura de enzimação no perfil de textura dos pedaços (figura 17). Foram preparadas 3 amostras de

diferenças significativas em nenhum dos parâmetros. A enzimação provocou um aumento de intensidade em todos os descritores utilizados exceto na suculência (figura 18).

Tabela 10 Amostras utilizadas na avaliação da influência do tempo no perfil de textura. Temperatura de enzimação de 25°C

Tempo de enzimação (h)	Firmeza (N)
Sem tratamento (IQF)	12,8
14	38,4
35	76,2

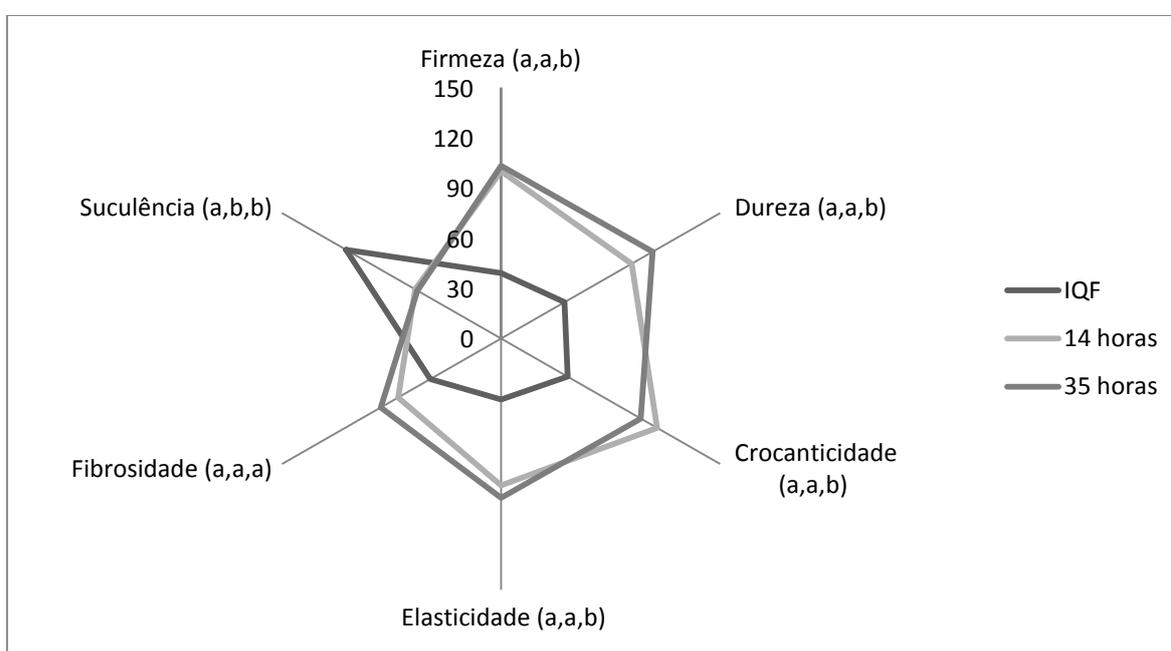


Figura 18 Perfis de textura de pedaços de morango enzimados ao longo do tempo à temperatura de 25°C

Foi efetuado um outro teste de análise sensorial no sentido de tentar compreender melhor as diferenças existentes entre os perfis de textura dos pedaços enzimados em relação ao morango fresco. Foi utilizada uma amostra de morango fresco e uma amostra com pedaços de morango enzimados durante 40 minutos à temperatura de 40°C, com uma firmeza de 31,9 N. Podemos verificar que utilizando um tempo de enzimação curto é possível obter perfis de textura semelhantes entre os morangos frescos e os morangos enzimados. Apesar dos perfis de textura serem semelhantes é possível distinguir diferenças significativas na firmeza, onde os pedaços de morango fresco são mais firmes. No caso da elasticidade verifica-se o oposto, os morangos enzimados são mais elásticos (figura 19).

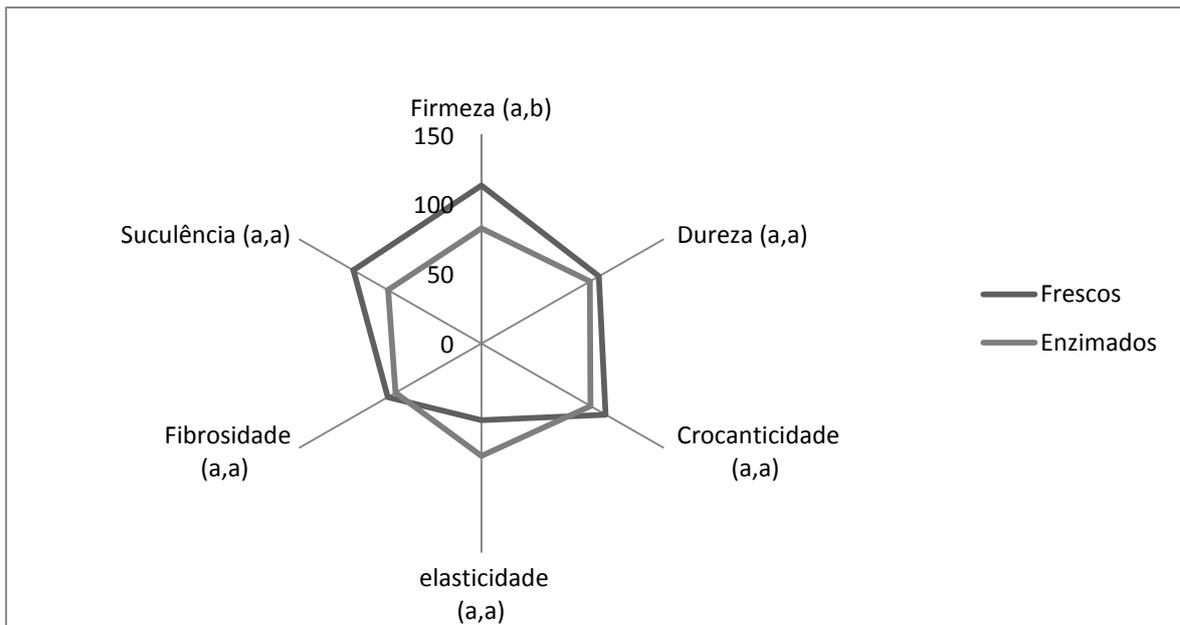


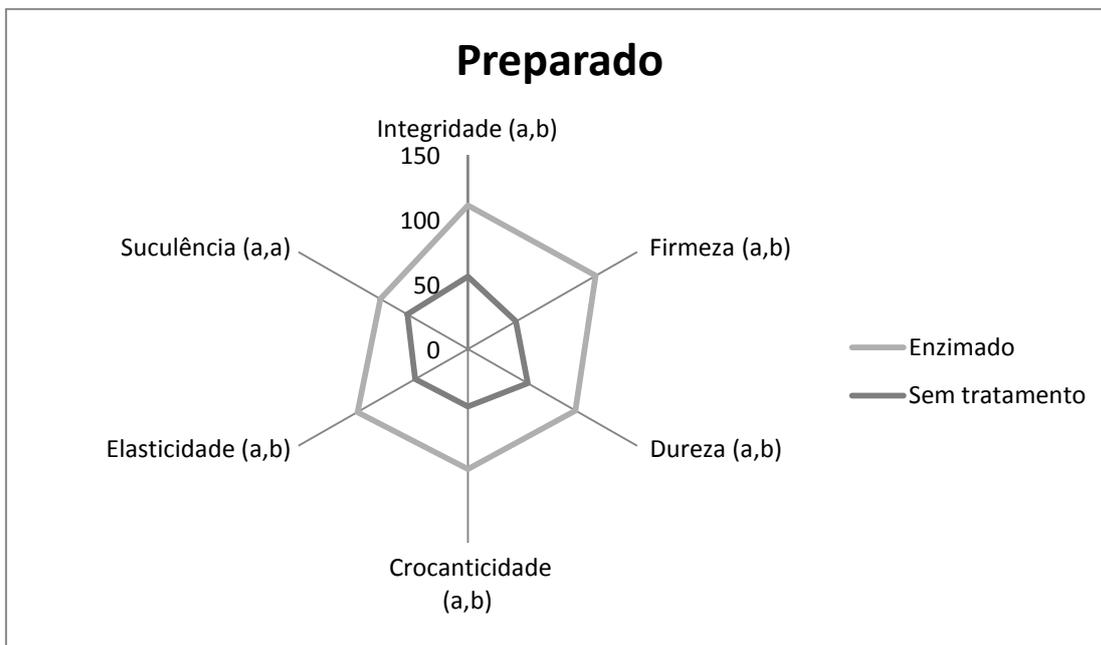
Figura 19 Comparação do perfil de textura de pedaços de morango frescos e enzimados durante 40 minutos a 40 °C.

A análise sensorial foi agora efetuada após a incorporação dos pedaços em preparado e aplicados em iogurte. O parâmetro da fibrosidade foi retirado devido à sua baixa relevância sendo adicionado um descritor para avaliar a integridade dos pedaços em termos visuais.

Os pedaços de morango enzimado mostraram diferenças estatisticamente significativas em todos os descritores exceto na suculência. Nesta análise sensorial parâmetro da suculência foi considerado difícil de avaliar por parte dos provadores. Os morangos enzimados aparentam uma melhor integridade em termos visuais, são mais firmes, têm uma dureza superior, são mais crocantes e mais elásticos (figura 20).

A aplicação em iogurte aumentou as diferenças verificadas anteriormente. A integridade dos pedaços mostrou ser muito superior com o tratamento enzimático. Em de firmeza, dureza, crocância e elasticidade os morangos enzimados mostraram ser bastante superiores.

a)



b)

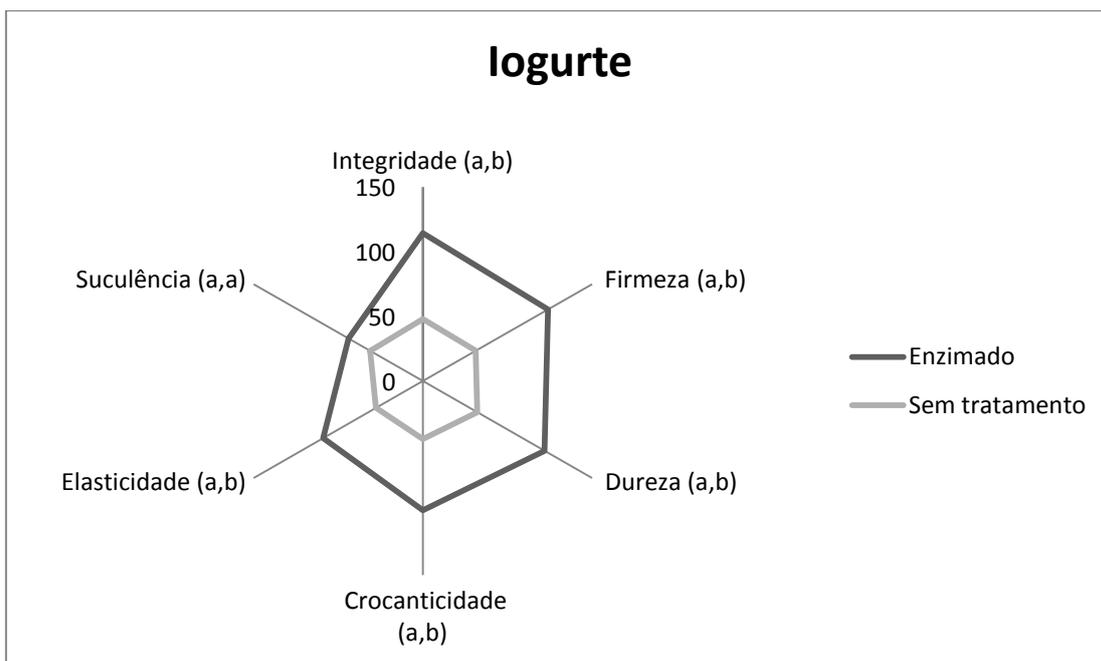


Figura 20. Comparação dos perfis de textura dos pedaços de morango enzimados e pedaços sem tratamento a) após incorporação em preparado b) após a aplicação em iogurte

4 Conclusão

Através da utilização de uma PME é possível aumentar a firmeza dos pedaços de morango. O aumento de firmeza depende do tempo de enzimagem assim como da temperatura. Utilizando uma temperatura de enzimagem superior é possível obter aumentos de firmeza mais rapidamente.

O tempo de enzimagem revelou ser um fator importante uma vez que quanto mais longo o tratamento enzimático maior é o aumento de firmeza causado nos pedaços. Esse aumento verifica-se até atingir uma assíntota, ou seja, uma firmeza máxima a partir da qual o aumento de tempo deixa de ter influência. Foi possível adaptar os dados obtidos ao modelo matemático, one-phase association. Deste modo foi possível relacionar a firmeza dos pedaços com o tempo de enzimagem através de uma constante de velocidade de enzimagem, k . Através da equação de Arrhenius foi possível relacionar o k em função da temperatura. A incorporação em preparado causa uma perda de firmeza nos pedaços independentemente de terem ou não sofrido tratamento enzimático. Contudo a enzimagem dos morangos permitiu obter pedaços de maiores dimensões após a incorporação em preparado.

Em termos de análise sensorial os morangos enzimados revelaram ter um perfil de textura diferente dos morangos não tratados. Com a enzimagem há um aumento em termos de firmeza, dureza, crocância e elasticidade em relação aos morangos sem tratamento. A utilização da PME mais cloreto de cálcio permitiu atingir firmeza, dureza e crocância semelhante ao morango fresco contudo revelou ter uma maior elasticidade e uma menor suculência. As diferenças verificadas na suculência não são significativas quando os pedaços estão incorporados em iogurte. A adição de uma PME exógena com cloreto de cálcio permite uma valorização do produto em termos de rendimento na quantidade de pedaços assim como uma melhoria em termos sensoriais.

5 Bibliografía

- [1] "Agricultural commodity markets past developments fruits and vegetables an analysis of consumption, production and trade based on statistics from the Food and Agriculture Organisation (FAO)," European commission 2007.
- [2] D. K. Salunkhe and S. S. SKadam, *Fruit science and technology* 1. New York: Marcel Dekker, Inc, 1995.
- [3] R. H. Liu, "Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals," *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 517S-520S, September 1, 2003 2003.
- [4] J. Aguilera and D. Stanley, *Microstructural principles of food processing and engineering*. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1999.
- [5] D. N. Sila, S. Van Buggenhout, T. Duvetter, I. Fraeye, A. De Roeck, A. Van Loey, and M. Hendrickx, "Pectins in Processed Fruits and Vegetables: Part II—Structure–Function Relationships," *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 86-104, 2009.
- [6] S. Van Buggenhout, D. N. Sila, T. Duvetter, A. Van Loey, and M. Hendrickx, "Pectins in Processed Fruits and Vegetables: Part III—Texture Engineering," *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 105-117, 2009.
- [7] K. Dietrich, "Technology aspects related to microorganisms in functional foods," *Trends in Food Science & Technology*, 9, 295-306, 1998.
- [8] L. C. Greve, K. A. Shackel, H. Ahmadi, R. N. McArdle, J. R. Gohlke, and J. M. Labavitch, "Impact of Heating on Carrot Firmness: Contribution of Cellular Turgor," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2896-2899, 1994/12/01 1994.
- [9] J. P. Van Buren, "The chemistry of texture in fruits and vegetables," *Journal of Texture Studies*, 10, 1-23, 1979.
- [10] M. Brown, "Effects of freezing on fruit and vegetable structure," *Food Technology*, 106–9., 1976.
- [11] P. Stepkonus, *Freeze-induced dehydration and the cryostability of biological membranes*. Lancaster, Pa: Technomic Publishing Co, 1999.
- [12] J. Munoz-Delgado, *Effects of freezing, storage and distribution on quality and nutritive attributes of foods, in particular fruit and vegetables*. London: Applied Science Publishers, 1977.
- [13] R. Azodanlou, C. Darbellay, J.-L. Luisier, J.-C. Villettaz, and R. Amadó, "Quality Assessment of Strawberries (Fragaria Species)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 715-721, 2003/01/01 2002.
- [14] A. A. Kader, pp. , "Quality and its maintenance in relation to postharvest physiology of strawberry," presented at the The strawberry into the 21st century, proceeding of the third north , American strawberry conference, Houston, Texas, 1990.
- [15] C. Caner, M. Aday, and M. Demir, "Extending the quality of fresh strawberries by equilibrium modified atmosphere packaging," *European Food Research and Technology*, 227, 1575-1583, 2008.
- [16] S. Jiménez-Bermúdez, J. Redondo-Nevado, J. Muñoz-Blanco, J. L. Caballero, J. M. López-Aranda, V. Valpuesta, F. Pliego-Alfaro, M. A. Quesada, and J. A. Mercado, "Manipulation of Strawberry Fruit Softening by Antisense Expression of a Pectate Lyase Gene," *Plant Physiology*, 128, 751-759, February 1, 2002 2002.
- [17] S. Van Buggenhout, I. Messagie, V. Maes, T. Duvetter, A. Van Loey, and M. Hendrickx, "Minimizing texture loss of frozen strawberries: effect of infusion with pectinmethylesterase and calcium combined with different freezing conditions and effect of subsequent storage/thawing conditions," *European Food Research and Technology*, 223, 395-404, 2006.
- [18] D. Zhan, P. Janssen, and A. J. Mort, "Scarcity or complete lack of single rhamnose residues interspersed within the homogalacturonan regions of citrus pectin," *Carbohydrate Research*, 308, 373-380, 1998.
- [19] M. O. Gross, V. N. M. Rao, and C. J. B. Smit, "Rheological characterization of low-methoxyl pectin gel by normal creep and relaxation," *Journal of Texture Studies*, 11, 271-290, 1980.
- [20] M. Debra, "Pectin structure and biosynthesis," *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 266-277, 2008.
- [21] B. L. Ridley, M. A. O'Neill, and D. Mohnen, "Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling," *Phytochemistry*, 57, 929-967, 2001.

- [22] F. Guillemin, F. Guillon, E. Bonnin, M.-F. Devaux, T. Chevalier, J. Knox, F. Liners, and J.-F. Thibault, "Distribution of pectic epitopes in cell walls of the sugar beet root," *Planta*, 222, 355-371, 2005.
- [23] M. A. O'Neill, T. Ishii, P. Albersheim, and A. G. Darvill, "Rhamngalacturonan II: Structure and Function of a Borate Cross-Linked Cell Wall Pectic Polysaccharide," *Annual Review of Plant Biology*, 55, 109-139, 2004.
- [24] T. Matsunaga, T. Ishii, S. Matsumoto, M. Higuchi, A. Darvill, P. Albersheim, and M. A. O'Neill, "Occurrence of the Primary Cell Wall Polysaccharide Rhamnogalacturonan II in Pteridophytes, Lycophytes, and Bryophytes. Implications for the Evolution of Vascular Plants," *Plant Physiology*, 134, 339-351, January 1, 2004 2004.
- [25] J. Zandleven, S. O. Sørensen, J. Harholt, G. Beldman, H. A. Schols, H. V. Scheller, and A. J. Voragen, "Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of *Arabidopsis thaliana*," *Phytochemistry*, 68, 1219-1226, 2007.
- [26] J. N. BeMiller and G. V. Kumari, "beta-elimination in uronic acids: evidence for an ElcB mechanism," *Carbohydrate Research*, 25, 419-428, 1972.
- [27] S. M. Krall and R. F. McFeeters, "Pectin Hydrolysis: Effect of Temperature, Degree of Methylation, pH, and Calcium on Hydrolysis Rates," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1311-1315, 1998/04/01 1998.
- [28] T. Sajjaanantakul, J. P. Van Buren, and D. L. Downing, "Effect of Methyl Ester Content on Heat Degradation of Chelator-Soluble Carrot Pectin," *Journal of Food Science*, 54, 1272-1277, 1989.
- [29] B. R. Thakur, R. K. Singh, A. K. Handa, and M. A. Rao, "Chemistry and uses of pectin — A review," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 47-73, 1997/02/01 1997.
- [30] G. T. Grant, E. R. Morris, D. A. Rees, P. J. C. Smith, and D. Thom, "Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model," *FEBS Letters*, 32, 195-198, 1973.
- [31] D. A. Powell, E. R. Morris, M. J. Gidley, and D. A. Rees, "Conformations and interactions of pectins: II. Influence of residue sequence on chain association in calcium pectate gels," *Journal of Molecular Biology*, 155, 517-531, 1982.
- [32] A. Stephen J, "Complexes of Metal Cations with Carbohydrates in Solution," in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. vol. Volume 47, R. S. Tipson and H. Derek, Eds., ed: Academic Press, 1989, pp. 1-43.
- [33] M. Baier, R. Goldberg, A.-M. Catesson, M. Liberman, N. Bouchemal, V. Michon, and C. H. Penhoat, "Pectin changes in samples containing poplar cambium and inner bark in relation to the seasonal cycle," *Planta*, 193, 446-454, 1994.
- [34] B. L. Cantarel, P. M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard, and B. Henrissat, "The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics," *Nucleic Acids Research*, 37, D233-D238, January 1, 2009 2009.
- [35] R. P. Jolie, T. Duvetter, A. M. Van Loey, and M. E. Hendrickx, "Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review," *Carbohydrate Research*, 345, 2583-2595, 2010.
- [36] T. Duvetter, D. N. Sila, S. Van Buggenhout, R. Jolie, A. Van Loey, and M. Hendrickx, "Pectins in Processed Fruit and Vegetables: Part I—Stability and Catalytic Activity of Pectinases," *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 75-85, 2009.
- [37] D. R. Kashyap, P. K. Vohra, S. Chopra, and R. Tewari, "Applications of pectinases in the commercial sector: a review," *Bioresource Technology*, 77, 215-227, 2001.
- [38] L. Rexová-Benková and O. Markovič, "Pectic Enzymes," in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. vol. Volume 33, R. S. Tipson and H. Derek, Eds., ed: Academic Press, 1976, pp. 323-385.
- [39] J. A. E. Benen, G. J. W. M. van Alebeek, and A. G. J. Voragen, *Pectic Esterases*: Marcel Dekker, 2003.
- [40] R. Tangwongchai, D. A. Ledward, and J. M. Ames, "Effect of high-pressure treatment on the texture of cherry tomato," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1434-1441, May 2000.
- [41] L. Peeters, D. Fachin, C. Smout, A. van Loey, and M. E. Hendrickx, "Influence of β -subunit on thermal and high-pressure process stability of tomato polygalacturonase," *Biotechnology and Bioengineering*, 86, 543-549, 2004.
- [42] D. Rodrigo, C. Cortes, E. Clynen, L. Schoofs, A. Van Loey, and M. Hendrickx, "Thermal and high-pressure stability of purified polygalacturonase and pectinmethylesterase from four different tomato processing varieties," *Food Research International*, 39, 440-448, 2006.
- [43] S. Lievens, S. Goormachtig, S. Herman, and M. Holsters, "Patterns of pectin methylesterase transcripts in developing stem nodules of *Sesbania rostrata*," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15, 164-168, 2002.

- [44] T. Nakagawa, T. Miyaji, H. Yurimoto, Y. Sakai, N. Kato, and N. Tomizuka, "A methylotrophic pathway participates in pectin utilization by *Candida boidinii*," *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4253-4257, 2000.
- [45] Z. Shen, G. Manning, J. C. Reese, and G. R. Reeck, "Pectin methylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): Purification and characterization," *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29, 209-214, 1999.
- [46] R. Ma, J. C. Reese, W. C. Black Iv, and P. Bramel-Cox, "Detection of pectinesterase and polygalacturonase from salivary secretions of living greenbugs, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae)," *Journal of Insect Physiology*, 36, 507-512, 1990.
- [47] M. Fabienne, "Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology," *Trends in Plant Science*, 6, 414-419, 2001.
- [48] S. Wolf, G. Mouille, and J. Pelloux, "Homogalacturonan methyl-esterification and plant development," *Molecular Plant*, 2, 851-860, 2009.
- [49] M. Bosch and P. K. Hepler, "Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tubes," *Plant Cell*, 17, 3219-3226, 2005.
- [50] v. A. G.-J. Benen JAE, Voragen AGJ, Visser J., *Handbook of food enzymology*. New York: Marcel Dekker, Inc., 2003.
- [51] M. Bordenave, "Analysis of pectin methyl esterases," *Plant cell wall analysis*, Springer-Verlag, 165-80, 1996.
- [52] Joannes NARI, G. NOAT, and J. RICARD, "Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension," *Biochemical Journal*, 279, 343-350, 1991.
- [53] B. Ly Nguyen, A. Van Loey, D. Fachin, I. Verlent, and I. M. Hendrickx, "Purification, characterization, thermal, and high-pressure inactivation of pectin methylesterase from bananas (cv Cavendish)," *Biotechnology and Bioengineering*, 78, 683-691, 2002.
- [54] Y. Guiavarc'h, D. Sila, T. Duvetter, A. Van Loey, and M. Hendrickx, "Influence of sugars and polyols on the thermal stability of purified tomato and cucumber pectinmethylesterases: a basis for TTI development," *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 544-555, 2003.
- [55] L. Plaza, T. Duvetter, I. V. d. Plancken, F. Meersman, A. V. Loey, and M. Hendrickx, "Influence of environmental conditions on thermal stability of recombinant *Aspergillus aculeatus* pectinmethylesterase," *Food Chemistry*, 111, 912-920, 2008.
- [56] D. N. Sila, C. Smout, Y. Satara, V. Truong, A. V. Loey, and M. Hendrickx, "Combined thermal and high pressure effect on carrot pectinmethylesterase stability and catalytic activity," *Journal of Food Engineering*, 78, 755-764, 2007.
- [57] C. S. Nunes, S. M. Castro, J. A. Saraiva, M. A. Coimbra, M. E. Hendrickx, and A. M. Van Loey, "Thermal and high-pressure stability of purified pectin methylesterase from plums (*Prunus domestica*)," *Journal of Food Biochemistry*, 30, 138-154, 2006.
- [58] M. Fries, J. Ihrig, K. Brocklehurst, V. E. Shevchik, and R. W. Pickersgill, "Molecular basis of the activity of the phytopathogen pectin methylesterase," *EMBO Journal*, 26, 3879-3887, 2007.
- [59] G. J. W. M. Van Alebeek, K. Van Scherpenzeel, G. Beldman, H. A. Schols, and A. G. J. Voragen, "Partially esterified oligogalacturonides are the preferred substrates for pectin methylesterase of *Aspergillus niger*," *Biochemical Journal*, 372, 211-218, 2003.
- [60] J. Nari, G. Noat, G. Diamantidis, M. Woudstra, and J. Ricard, "Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. 3. Interplay between limited cell-wall autolysis, pectin methyl esterase activity and electrostatic effects in soybean cell walls," *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 155, 199-202, 1986.
- [61] A. Moustacas, J. Nari, M. Borel, G. Noat, and J. Ricard, "Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. The role of metal ions in plant cell-wall extension," *Biochemical Journal*, 279, 351-354, 1991.
- [62] J. Nari, G. Noat, and J. Ricard, "Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. Hydrolysis of pectin by plant cell-wall pectin methylesterase," *Biochemical Journal*, 279, 343-350, 1991.
- [63] V. A. Leitinger and L. Wicker, "Inorganic Cations and Polyamines Moderate Pectinesterase Activity," *Journal of Food Science*, 62, 253-255, 1997.
- [64] D. Sun and L. Wicker, "Kinetic compensation and the role of cations in pectinesterase catalysis," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1471-1475, 1999.
- [65] G. Limberg, R. Körner, H. C. Buchholt, T. M. I. E. Christensen, P. Roepstorff, and J. D. Mikkelsen, "Analysis of different de-esterification mechanisms for pectin by enzymatic fingerprinting using endopectin lyase and endopolygalacturonase II from *A. Niger*," *Carbohydrate Research*, 327, 293-307, 2000.

- [66] T. Duvetter, I. Fraeye, D. N. Sila, I. Verlent, C. Smout, M. Hendrickx, and A. Van Loey, "Mode of de-esterification of alkaline and acidic pectin methyl esterases at different pH conditions," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7825-7831, 2006.
- [67] M. C. Ralet and J. F. Thibault, "Interchain heterogeneity of enzymatically deesterified lime pectins," *Biomacromolecules*, 3, 917-925, 2002.
- [68] R. G. Cameron, G. A. Luzio, K. Goodner, and M. A. K. Williams, "Demethylation of a model homogalacturonan with a salt-independent pectin methyl-esterase from citrus: I. Effect of pH on demethylated block size, block number and enzyme mode of action," *Carbohydrate Polymers*, 71, 287-299, 2008.
- [69] Y. Kim, Q. Teng, and L. Wicker, "Action pattern of Valencia orange PME de-esterification of high methoxyl pectin and characterization of modified pectins," *Carbohydrate Research*, 340, 2620-2629, 2005.
- [70] W. G. T. Willats, C. Orfila, G. Limberg, H. C. Buchholt, G.-J. W. M. van Alebeek, A. G. J. Voragen, S. E. Marcus, T. M. I. E. Christensen, J. D. Mikkelsen, B. S. Murray, and J. P. Knox, "Modulation of the Degree and Pattern of Methyl-esterification of Pectic Homogalacturonan in Plant Cell Walls," *Journal of Biological Chemistry*, 276, 19404-19413, June 1, 2001 2001.
- [71] A. G. J. Voragen, G. J. Coenen, R. P. Verhoef, and H. A. Schols, "Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls," *Structural Chemistry*, 20, 263-275, 2009.
- [72] W. G. T. Willats, L. McCartney, W. Mackie, and J. P. Knox, "Pectin: Cell biology and prospects for functional analysis," *Plant Molecular Biology*, 47, 9-27, 2001.
- [73] J. Pelloux, C. Rustérucchi, and E. J. Mellerowicz, "New insights into pectin methyl-esterase structure and function," *Trends in Plant Science*, 12, 267-277, 2007.
- [74] S. Al-Qsous, E. Carpentier, D. Klein-Eude, C. Burel, A. Mareck, H. Dauchel, V. Gomord, and A. P. Balangé, "Identification and isolation of a pectin methyl-esterase isoform that could be involved in flax cell wall stiffening," *Planta*, 219, 369-378, 2004.
- [75] T. D. Phan, W. Bo, G. West, G. W. Lycett, and G. A. Tucker, "Silencing of the major salt-dependent isoform of pectinesterase in tomato alters fruit softening," *Plant Physiology*, 144, 1960-1967, 2007.
- [76] M. Draye and P. Van Cutsem, "Pectin methyl-esterases induce an abrupt increase of acidic pectin during strawberry fruit ripening," *Journal of Plant Physiology*, 165, 1152-1160, 2008.
- [77] J. Pilling, L. Willmitzer, and J. Fisahn, "Expression of a *Petunia inflata* pectin methyl esterase in *Solanum tuberosum* L. enhances stem elongation and modifies cation distribution," *Planta*, 210, 391-399, 2000.
- [78] J. Pilling, L. Willmitzer, H. Bücking, and J. Fisahn, "Inhibition of a ubiquitously expressed pectin methyl esterase in *Solanum tuberosum* L. affects plant growth, leaf growth polarity, and ion partitioning," *Planta*, 219, 32-40, 2004.
- [79] C. Ren and A. R. Kermode, "An increase in pectin methyl esterase activity accompanies dormancy breakage and germination of yellow cedar seeds," *Plant Physiology*, 124, 231-242, 2000.
- [80] M. H. Chen and V. Citovsky, "Systemic movement of a tobamovirus requires host cell pectin methyl-esterase," *Plant Journal*, 35, 386-392, 2003.
- [81] M. H. Chen, J. Sheng, G. Hind, A. K. Handa, and V. Citovsky, "Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methyl-esterases is required for viral cell-to-cell movement," *EMBO Journal*, 19, 913-920, 2000.
- [82] S. Osorio, C. Castillejo, M. A. Quesada, N. Medina-Escobar, G. J. Brownsey, R. Suau, A. Heredia, M. A. Botella, and V. Valpuesta, "Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase 1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry (*Fragaria vesca*)," *Plant Journal*, 54, 43-55, 2008.
- [83] E. Körner, C. C. Von Dahl, G. Bonaventure, and I. T. Baldwin, "Pectin methyl-esterase NaPME1 contributes to the emission of methanol during insect herbivory and to the elicitation of defence responses in *Nicotiana attenuata*," *Journal of Experimental Botany*, 60, 2631-2640, 2009.
- [84] T. V. Gasanova, E. V. Skurat, O. Y. Frolova, M. A. Semashko, and Y. L. Dorokhov, "Pectin methyl-esterase as a factor of plant transcriptome stability," *Molecular Biology*, 42, 421-429, 2008.
- [85] C. De-la-Peña, D. V. Badri, and J. M. Vivanco, "Novel role for pectin methyl-esterase in *Arabidopsis*: A new function showing ribosome-inactivating protein (RIP) activity," *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1780, 773-783, 2008.
- [86] D. A. Brummell and M. H. Harpster, "Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants," *Plant Molecular Biology*, 47, 311-340, 2001.
- [87] K. Wakabayashi, T. Hoson, and D. J. Huber, "Methyl de-esterification as a major factor regulating the extent of pectin depolymerization during fruit ripening: A comparison of the action of avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) polygalacturonases," *Journal of Plant Physiology*, 160, 667-673, 2003.

- [88] D. W. Abbott and A. B. Boraston, "Structural biology of pectin degradation by Enterobacteriaceae," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72, 301-316, 2008.
- [89] S. Yadav, P. K. Yadav, D. Yadav, and K. D. S. Yadav, "Pectin lyase: A review," *Process Biochemistry*, 44, 1-10, 2009.
- [90] A. J. Rosenthal, *Food texture Measurement and Perception*. Oxford: Aspen Publisher, 1999.
- [91] S. Alina Surmacka, "Texture is a sensory property," *Food Quality and Preference*, 13, 215-225, 2002.
- [92] R. L. Shewfelt "What is quality?," *Postharvest Biology and Technology*, 15, 197-200, 1999.
- [93] A. S. Szczesniak and E. L. Kahn, "Consumer awareness of and attitudes to food texture," *Journal of Texture Studies*, 2, 280-295, 1971.
- [94] J. Suutarinen, K. Honkapää, R. L. Heiniö, K. Autio, and M. Morkkila, "The Effect of Different Prefreezing Treatments on the Structure of Strawberries Before and After Jam Making," *LWT - Food Science and Technology*, 33, 188-201, 2000.
- [95] I. Fraeye, G. Knockaert, S. V. Buggenhout, T. Duvetter, M. Hendrickx, and A. V. Loey, "Enzyme infusion and thermal processing of strawberries: Pectin conversions related to firmness evolution," *Food Chemistry*, 114, 1371-1379, 2009.
- [96] R. S. Jayani, S. Saxena, and R. Gupta, "Microbial pectinolytic enzymes: A review," *Process Biochemistry*, 40, 2931-2944, 2005.
- [97] P. Massiot, V. Perron, A. Baron, and J. F. Drilleau, "Release of Methanol and Depolymerization of Highly Methyl Esterified Apple Pectin with an Endopolygalacturonase from *Aspergillus niger* and Pectin Methylsterases from *A. niger* or from Orange," *LWT - Food Science and Technology*, 30, 697-702, 1997.