

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

DANIELA GOETZE

**AVALIAÇÃO DO USO DE FARINHA DE PENA COMO COADJUVANTE
PROTEICO NA PREPARAÇÃO DE COMBI-CLEAS APLICADOS À
CLARIFICAÇÃO DO SUCO DE UVA**

**PORTO ALEGRE
DEZEMBRO DE 2016**

Daniela Goetze

**AVALIAÇÃO DO USO DE FARINHA DE PENA COMO COADJUVANTE
PROTEICO NA PREPARAÇÃO DE COMBI-CLEAS APLICADOS À
CLARIFICAÇÃO DO SUCO DE UVA**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade Federal do
Rio Grande do Sul como requisito parcial
para obtenção do título de Engenheiro de
Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues

Coorientador: Msc. Lucas Dal Magro

Porto Alegre

Dezembro de 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

**AVALIAÇÃO DO USO DE FARINHA DE PENA COMO COADJUVANTE
PROTEICO NA PREPARAÇÃO DE COMBI-CLEAS APLICADOS À
CLARIFICAÇÃO DO SUCO DE UVA**

Daniela Goetze

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA:

Rafael Costa Rodrigues
Doutor em Engenharia Química
ICTA/UFRGS

Lucas Dal Magro
Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos
ICTA/UFRGS

Plinho Francisco Hertz
Doutor em Ciência de Alimentos
ICTA/UFRGS

Natália Guilherme Graebin
Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos
ICTA/UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Rafael Costa Rodrigues e o meu coorientador Lucas Dal Magro, pela disponibilidade, pelos ensinamentos e pelo apoio na conclusão deste trabalho.

Aos bolsistas, Halisson e Vitória, e à amiga, Eliara, pelas suas colaborações durante a realização dos experimentos deste trabalho, por sempre estarem dispostos a medir qualquer atividade.

À amiga do Laboratório de Biocatálise e Tecnologia Enzimática, Luiza, pelos momentos de descontração.

A todos os colegas formandos por compartilhar momentos e sentimentos e pelo apoio e motivação. Em especial a Isadora, Alexandre, Géssica e Joana, que estiveram muito presentes nessa reta final.

Ao meu irmão pela paciência e pelos ensinamentos de vida. Ao meu pai pelos baldes de pipoca que me moveram durante este trabalho. A minha mãe pelo exemplo que me guia. Aos meus dindos, dindas, tios, tias, primos, primas e nona pela compreensão da minha ausência.

Às minhas amigas, Mariana, Valentina e Carolina, pela amizade incondicional. Ao eterno chefinho Fábio por dividir os bons e maus momentos. Às minhas parceiras desde o começo dessa jornada, Ana Carolina, Cintia, Fernanda, Patrícia e Vanessa.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1 SUCO DE UVA	15
1.2 ENZIMAS PECTINOLÍTICAS.....	16
1.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	17
1.3.1 Preparação de CLEAs	20
1.3.2 Parâmetros relevantes para preparação de CLEAs	21
2 MATERIAIS E MÉTODOS	24
2.1 MATERIAIS.....	24
2.1.1 Preparação enzimática.....	24
2.1.2 Suco de uva	24
2.1.3 Farinha de pena	24
2.1.4 Reagentes	24
2.2 PREPARAÇÃO DE COMBI-CLEAS	25
2.2.1 Seleção do agente precipitante.....	25
2.2.2 Planejamento experimental para otimização da preparação de combi-CLEAs.....	26
2.2.3 Preparação de combi-CLEAs com BSA e FP.....	26
2.2.4 Determinação da temperatura ótima	27
2.2.5 Determinação do pH ótimo.....	27
2.2.6 Avaliação da estabilidade térmica	27
2.2.7 Estabilidade operacional	28
2.3 CLARIFICAÇÃO DE SUCO DE UVA.....	29
2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	29
2.4.1 Determinação da atividade de pectinase total (PE)	29
2.4.2 Quantificação de proteínas	30
2.4.3 Determinação da turbidez.....	30
2.5 ANÁLISES DE DADOS.....	31
3 RESULTADOS	32
4 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	49

REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS.....	51
APÊNDICE A	57

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1: Diferentes tipos de pectinases e seus mecanismos de ação em substâncias pécticas 17
- Figura 2: Diferentes métodos de imobilização enzimática 18
- Figura 3: Esquema da produção de CLEAs 20

Capítulo 3

- Figure 1: Effect of different precipitant agents on combi-CLEAs activity recovery. Data with same letter are not statistically different. 38
- Figure 2: Interaction between (a) time and glutaraldehyde concentration, (b) glutaraldehyde concentration and enzymatic preparation and (c) time and enzymatic preparation (for all figures: level -1: dashed line; level 1: continuous line)..... 40
- Figure 3: Effect of proteic feeders in combi-CLEAs preparation (a) FM and (b) BSA. 42
- Figure 4: Relative activity of free enzyme (◆), combi-CLEA (□), combi-CLEA-FM (▲) and combi-CLEA-BSA (○) under different conditions of (a) Temperature and (b) pH..... 43
- Figure 5: Reusability of combi-CLEA (□), combi-CLEA-FM (▲) and combi-CLEA-BSA (○) for pectin hydrolysis 44
- Figure 6: Effect of free enzyme, combi-CLEA, combi-CLEA-FM and combi-CLEA-BSA on grape juice clarification..... 45

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1: Planejamento experimental para otimização do preparado de combi-CLEAs	26
---	----

Capítulo 3

Table 1: Experimental design and results of activity recovery of CLEAs	39
Table 2: Statistical analysis of experimental design.....	39
Table 3: Half-life of free enzyme, combi-CLEA, combi-CLEA-FM and combi-CLEA-BSA	42

LISTA DE ABREVIATURAS

CLEA: agregado enzimático entrecruzado

Combi-CLEA: agregado enzimático entrecruzado combinado

Combi-CLEA-FP: agregado enzimático entrecruzado combinado com adição de farinha de pena

Combi-CLEA-FM: agregado enzimático entrecruzado combinado com adição de farinha de pena

Combi-CLEA-BSA: agregado enzimático entrecruzado combinado com adição de albumina de soro bovino

RESUMO

Durante a fabricação de suco de uva, enzimas pectinolíticas são utilizadas na etapa de clarificação a fim de reduzir viscosidade e turbidez, melhorando o aspecto visual do suco. Os preparados enzimáticos comerciais utilizados se apresentam na forma de mistura de diferentes enzimas, como pectinases, celulasas e hemicelulasas, que atuam de forma sinérgica para melhor hidrólise de diferentes polissacarídeos, responsáveis pela turbidez em sucos. A imobilização dessas enzimas pode conferir um aumento na eficiência desse processo. Neste caso, agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) são uma alternativa para imobilização de enzimas sem o uso de suporte físico. A farinha de pena é um resíduo industrial rico em proteína bruta. Assim, o objetivo deste trabalho foi a preparação de combi-CLEAs utilizando farinha de pena como coadjuvante proteico para aplicação na etapa de clarificação do suco de uva. Inicialmente, foi realizada a seleção do agente precipitante, no qual quatro solventes orgânicos foram utilizados sendo selecionado o etanol. Na sequência, as condições ótimas de tempo, concentração de agente entrecruzante e preparado enzimático foram determinados através de planejamento fatorial 2^3 . A partir dos dados obtidos, foram estabelecidas como condições ótimas 5 h de reação, 110 mM de glutaraldeído e $0,66 \text{ mg.mL}^{-1}$ de proteína, com as quais foi obtida uma atividade recuperada de 5,1%. O efeito de adição de albumina de soro bovino (BSA) e farinha de pena (FP) na preparação de combi-CLEAs foi avaliado, sob as condições ótimas pré-estabelecidas. Desta forma, 10 % de atividade foi recuperada com adição de $4,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ de FP e 5 % com adição de $0,66 \text{ mg.mL}^{-1}$ de BSA. Por fim, foram determinadas as condições ótimas de pH e temperatura, estabilidade térmica e operacional e eficiência de clarificação. A FP teve um efeito positivo na recuperação da atividade, estabilidade térmica e eficiência de clarificação. BSA teve efeito positivo na estabilidade térmica e operacional. Próximos estudos podem ser feitos com a adição combinada de FP e BSA, a fim de obter um efeito potencializado.

Palavras-chaves: farinha, pena, imobilização, clarificação, suco, uva

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores e consumidores de suco de uva do mundo, sendo o estado do Rio Grande do Sul o principal produtor (UVIBRA, 2015). A indústria de suco de uva tem crescido no Estado como uma alternativa de sustentabilidade às vitivinícolas, que têm enfrentado a queda da demanda de vinho nacional (Mello, 2015).

O consumo de suco de uva tem aumentado bastante no país, cerca de 570 % entre os anos de 2005 e 2010 (IBRAVIN, 2015). Um dos principais motivos é a extensa lista de benefícios à saúde associados ao consumo do produto, como prevenção de doenças cardiovasculares, redução da pressão arterial e redução de danos causados por radicais livres. Tais benefícios são atribuídos ao elevado poder antioxidante do suco, decorrente da alta concentração de compostos bioativos (Xia *et al.*, 2010; Dávalos *et al.*, 2004; Keevil *et al.*, 2000; Dani, 2008; Castilla *et al.*, 2006).

No processo de fabricação de suco de uva, preparados enzimáticos comerciais são utilizados para redução de turbidez e viscosidade, bem como para aumentar a extração de compostos bioativos, que além de propriedades nutraceuticas, melhoram aspectos de cor e sabor do produto final (Roldán *et al.*, 2006; Mieszczakowska-Frac *et al.*, 2012; Sandri *et al.*, 2011; Landbo *et al.*, 2007; Arneous e Meyer, 2010; Çinar, 2005). Os preparados comerciais são compostos por diversas enzimas, como poligalacturonase, pectina liase, pectina esterase, celulase e hemicelulase, que atuam em sinergia para potencializar a hidrólise de diferentes polissacarídeos. Para a etapa de clarificação, preparados ricos em pectinases são mais interessantes, pois a turbidez está relacionada à presença de substâncias pecticas em suspensão (Roldán *et al.*, 2006; Arneous e Meyer, 2010; Mieszczakowska-Frac *et al.*, 2012).

A imobilização de enzimas é uma estratégia que visa melhorar a estabilidade das enzimas, seja térmica, operacional ou ao armazenamento. Os métodos mais comuns de imobilização são: ligação a um suporte, encapsulamento e entrecruzamento. Nos dois primeiros casos, existe a necessidade de um suporte físico, o que eleva o custo de preparação e dilui a atividade volumétrica do

biocatalisador pela adição de massa inerte. Sendo assim, o entrecruzamento enzimático surge como uma opção para evitar tais problemas (Sheldon e van Pelt, 2013).

Agregados enzimáticos entrecruzados (*cross-linked enzymes aggregates* – CLEAs) constituem um método de imobilização de enzimas que não exige a utilização de suporte. A preparação de CLEAs se dá através da precipitação da enzima seguida do entrecruzamento das mesmas, formando um agregado insolúvel (Sheldon, 2011). Além disso, através desta metodologia é possível a co-imobilização de mais de uma enzima, dando origem aos chamados combi-CLEAs (Telekar *et al*, 2013).

Muitos fatores influenciam na eficácia da preparação de CLEAs, como a natureza da enzima, natureza e quantidade de agente precipitante e agente entrecruzante, tempo de precipitação e entrecruzamento e etapas finais de lavagem e separação (Telekar *et al*, 2013). Como todos estes fatores podem influenciar na preparação dos CLEAs, a otimização deste processo pode ser complexo e demorado. Quando as variáveis são analisadas isoladamente, a interação entre elas pode ser ignorada. Desta forma, recomenda-se a utilização da metodologia de superfície de resposta para análise das variáveis e otimização do procedimento de preparação dos CLEAs (Cruz *et al*, 2012, Morales *et al* 2015; Dal Magro, 2016a).

A etapa de entrecruzamento influencia diretamente a atividade, estabilidade e tamanho da partícula dos CLEAs preparados (Sheldon, 2011). O agente entrecruzante mais utilizado é o glutaraldeído, que é um solvente barato, de fácil manuseio e capaz de ligar-se com diversas enzimas (Telekar *et al*, 2013). Para a preparação de CLEAs, há uma concentração ótima de agente entrecruzante para cada enzima, que está diretamente ligado as diferentes quantidades de resíduo de lisina em sua superfície. Para enzimas com baixo teor de lisina, compostos ricos em grupamentos amino são adicionados a fim de melhorar o entrecruzamento enzimático. Compostos muito utilizados são a polietilenoimina e a albumina de soro bovino (BSA) (Sheldon, 2011; Telekar *et al*, 2013, Cruz *et al*, 2012).

A farinha de pena é um resíduo industrial proveniente da cocção de penas que possui alto teor de proteínas, principalmente queratina. A queratina é uma proteína com características estruturais e rica em resíduos de cistina (Sinhorini, 2013). Devido ao seu alto teor proteico e baixo custo, a utilização da farinha de pena

pode ser uma alternativa interessante como fonte de grupamentos amino para entrecruzamento de proteínas na preparação de CLEAs.

O objetivo principal deste trabalho é preparar combi-CLEAs de pectinases com a adição de coadjuvantes proteicos para clarificação de suco de uva. Logo, os objetivos específicos são:

- Selecionar o agente precipitante para preparação de combi-CLEAs;
- Determinar os parâmetros ótimos para a preparação de combi-CLEAs, através de planejamento experimental fatorial e metodologia de superfície de resposta;
- Avaliar o efeito da adição de albumina de soro bovino e farinha de penas na preparação de combi-CLEAs;
- Avaliar a estabilidade térmica e operacional dos combi-CLEAs preparados;
- Determinar as condições ótimas de pH e temperatura dos combi-CLEAs preparados;
- Avaliar o efeito dos combi-CLEAs preparados na clarificação do suco de uva.

Este trabalho de conclusão de curso foi desenvolvido principalmente no Laboratório de Biocatálise e Tecnologia Enzimática do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A apresentação do trabalho está organizada da seguinte forma: o Capítulo 1 apresenta uma revisão bibliográfica, no qual são abordados assuntos relevantes ao trabalho. No Capítulo 2 são descritos os Materiais e Métodos utilizados nos experimentos de forma detalhada. O Capítulo 3 expõe os resultados obtidos, bem a discussão desses, na forma de artigo científico que será submetido à publicação. Por fim, o Capítulo 4 apresenta as conclusões gerais desse trabalho e perspectivas para futuros trabalhos.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 SUCO DE UVA

Suco ou sumo é uma bebida não fermentada, obtida da fruta madura e sã, ou parte vegetal de origem, por processamento tecnológico adequado, submetida a tratamento que assegura a sua apresentação e conservação até o momento do consumo (Brasil, 1994). Quanto à cor, o suco de uva pode ser classificado como: tinto, rosado e branco. Quanto ao processamento e constituição, pode ser classificado como: suco de uva integral, suco de uva concentrado, suco de uva desidratado, suco de uva adoçado e suco de uva reprocessado (Rizzon e Meneguzzo, 2007).

O suco de uva é uma bebida refrescante e seu consumo traz benefícios à saúde, principalmente devido ao alto poder antioxidante. O poder antioxidante de bebidas derivadas da uva, incluindo o vinho, está relacionado à presença de compostos bioativos (Xia *et al.*, 2010; Dávalos *et al.*, 2004; Keevil *et al.*, 2000). Os efeitos benéficos associados ao consumo de suco são: redução de danos causados por radicais livres responsáveis pelo envelhecimento celular, prevenção de doenças cardiovasculares, redução da pressão arterial, prevenção de danos oxidativos ao DNA e estruturas cerebrais o que pode reduzir a incidência de doenças neurológicas (como o Alzheimer) e câncer (Dani, 2008; Castilla *et al.*, 2006).

Os principais compostos bioativos da uva responsáveis pelos benefícios à saúde são polifenóis, no qual se incluem as antocianinas, os flavonoides e o resveratrol (Xia *et al.*, 2010). Além de atributos nutracêuticos, estes compostos também contribuem para fatores de qualidade do suco, como cor e adstringência (Dani, 2008).

O suco de uva pode ser elaborado a partir das variedades *Vitis labrusca* ou *Vitis vinifera* desde que estejam no grau de maturação adequado, sendo a primeira utilizada nas Américas e a segunda na Europa. Dentre as espécies americanas, as mais utilizadas para produção de suco de uva são Concord, Bordô e Isabel, devido às suas propriedades de sabor e aroma (Dal Magro, 2016b; Dani, 2008).

O suco é extraído da fruta através de esmagamento e maceração. A primeira etapa deste processo é o desengace, que consiste na separação das bagas e ráquis. As bagas são então esmagadas com o objetivo de aumentar o contato do

líquido com a casca, aumentando assim a extração de cor e compostos bioativos presentes na casca. As uvas esmagadas são aquecidas sob agitação, a temperatura de cerca de 65 °C. O aquecimento é importante para eliminação de microrganismos e melhor extração da cor. Quando o aquecimento é demasiado, o suco perde qualidade sensorial devido ao gosto de cozido. Nesta etapa ocorre a adição de enzimas comerciais, principalmente celulasas e pectinases, com objetivo de facilitar o rompimento da parede celular e aumentar a extração do suco da matriz vegetal. A temperatura ideal para a ação de enzimas comerciais é de 55 a 60 °C, por cerca de 1 a 2 h. A etapa seguinte é a prensagem, na qual o suco é separado das partes sólidas da uva. O suco então segue para a etapa de clarificação que tem por objetivo reduzir sua turbidez. O suco clarificado é então pasteurizado e envasado (Rizon e Meneguzzo, 2007).

Na etapa de clarificação, enzimas comerciais com alta atividade de pectinases são utilizadas para proporcionar a hidrólise da pectina, que resulta em redução da turbidez e da viscosidade (Sandri *et al*, 2011).

1.2 ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

Pectinases são enzimas amplamente utilizadas na indústria de vinhos e sucos. Por muito tempo, a aplicação de enzimas pectinolíticas objetivavam apenas o aumento do rendimento da extração do suco e redução da turbidez do produto. Atualmente, com o uso dessas enzimas também almeja-se o aumento da extração de compostos bioativos, aromáticos e de cor (Roldán *et al*, 2006; Mieszczakowska-Frac *et al*, 2012; Sandri *et al*, 2011; Landbo *et al*, 2007; Arneos e Meyer, 2010; Çinar, 2005).

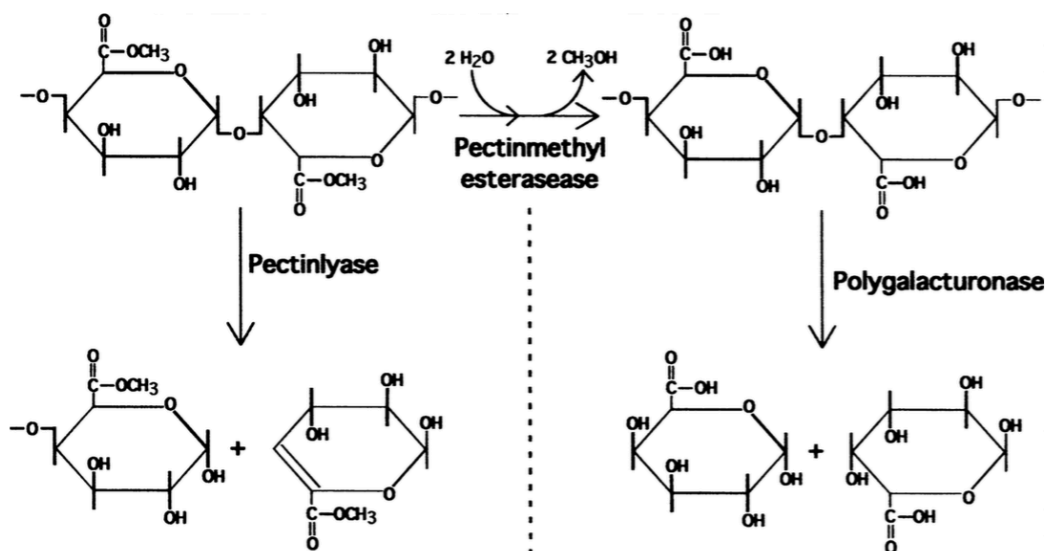
As pectinases atuam na degradação de substâncias pécticas, um dos principais polímeros que compõem a parede celular de tecidos vegetais (Da-Silva *et al*, 1997). A pectina é um polissacarídeo complexo, composto por uma cadeia principal de ácido poligalacturônico, em diferentes graus de esterificação, com ramificações de açúcares, unidas por ligações do tipo α -1,4 (Tapre e Jain, 2014; Kashyap *et al*, 2001).

As pectinases podem ser classificadas quanto ao substrato preferencial (pectina, ácido péctico ou oligo-D-galacturonato), quanto ao mecanismo de ação

(despolimerizantes ou desmetoxilantes) e quanto à clivagem (randômica ou terminal) (Tapre e Jain, 2014; Kashyap *et al*, 2001).

As principais enzimas pectinolíticas são pectina liase, poligalacturonase e pectina esterase, com ilustrado na Figura 1. As pectina liases são enzimas despolimerizantes que atuam na quebra de ligações glicosídicas entre resíduos de ácido galacturônico da pectina através da trans-eliminação de hidrogênio dos carbonos 4 e 5. Poligalacturonases são enzimas despolimerizantes que hidrolisam aleatoriamente as ligações glicosídicas internas dos resíduos de ácido galacturônico. Pectina esterases, ou pectina metil-esterases, são enzimas desmetoxilantes que removem grupos metoxílicos da pectina, formando polissacarídeos que podem ser hidrosados pelas poligalacturonases (Diano *et al*, 2008; Da-Silva *et al*, 1997; Tapre e Jain, 2014).

Figura 1: Diferentes tipos de pectinases e seus mecanismos de ação em substâncias pécicas



Fonte: Diano *et al*, 2008.

1.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Enzimas são ferramentas muito úteis em catálises industriais. São biocompatíveis, biodegradáveis, derivadas de fontes renováveis e altamente seletivas (Sheldon e van Pelt, 2013).

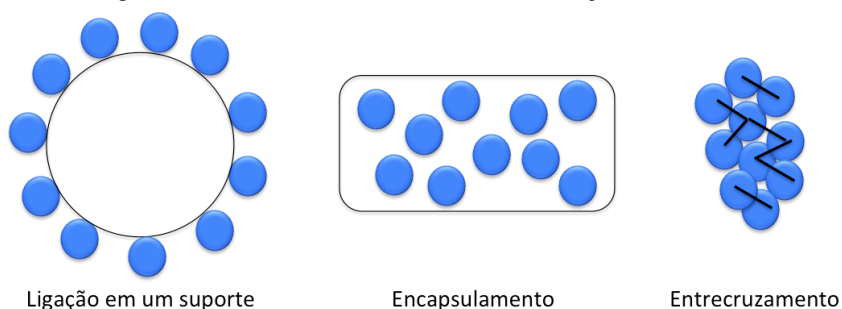
Os avanços científicos nas áreas da biotecnologia e engenharia de proteínas viabilizaram a produção de diversas enzimas para uso comercial, com custo aceitável e propriedades convenientes como especificidade, atividade, seletividade e estabilidade (Sheldon e van Pelt, 2013). A fim de aumentar a estabilidade operacional e atividade destas enzimas, de forma que suportem as condições de operação mais severas, utiliza-se a estratégia de imobilização (Telekar *et al*, 2013). Além disso, a imobilização facilita a reutilização da enzima, reduzindo seu custo efetivo (Sheldon e van Pelt, 2013).

Essencialmente, existem três métodos para imobilização enzimática: ligação em um suporte pré-fabricado, encapsulamento e entrecruzamento (Figura 2).

A imobilização em suporte sólido é feita através da ligação entre a enzima e o suporte, por interações de Van der Waals, ligações iônicas ou covalentes. Os suportes mais utilizados são polímeros sintéticos, naturais ou inorgânicos. Uma das desvantagens desse método é a possível perda de enzimas para o meio durante a reação, quando a ligação entre enzima e suporte é reversível. Para o encapsulamento de enzimas, o suporte é formado em conjunto com a solução enzimática, de forma que a enzima fique retida dentro da estrutura porosa formada (Sheldon e van Pelt, 2013).

A imobilização em suporte sólido, pré-fabricado ou não, traz desvantagens como a diminuição da atividade volumétrica, o que reduz o rendimento de tempo e espaço e, com isso, a produtividade. Além disso, a imobilização em suporte sólido é um processo caro, devido aos custos relacionados à preparação e funcionalização do suporte (Telekar *et al*, 2013; Sheldon e van Pelt, 2013). Novas tecnologias de imobilização vem sendo estudas com o objetivo de contornar tais inconveniências, como o entrecruzamento.

Figura 2: Diferentes métodos de imobilização enzimática



Fonte: adaptado de Sheldon e van Pelt, 2013.

Métodos de imobilização sem suporte, ou entrecruzamento, podem ser classificados em quatro tipos: enzimas entrecruzadas (*cross-linked enzymes* – CLEs), enzimas entrecruzadas em pó (*cross-linked spray dried enzymes* - CLSDs), cristais de enzimas entrecruzadas (*cross-linked enzymes crystals* - CLECs), e, agregados enzimático entrecruzado (*cross-linked enzymes aggregates* – CLEAs) (Telekar *et al*, 2013).

Enzimas entrecruzadas (CLEs) são obtidas através do entrecruzamento da enzima livre em solução. No entanto, a atividade recuperada é baixa, o procedimento não é reprodutível e apresenta baixa estabilidade mecânica. Enzimas entrecruzadas em pó (CLSDs) apresentam uma considerável recuperação da atividade enzimática, mas o procedimento de secagem (*spray drying*) causa desativação irreversível de algumas enzimas, tornando o procedimento pouco interessante. Os cristais de enzima entrecruzados (CLECs) apresentam boa recuperação de atividade, estabilidade mecânica e química e por isso já são comercializadas. Entretanto, o procedimento para cristalização das enzimas é trabalhoso e caro, o que desestimula o desenvolvimento dessa tecnologia. Sabendo do potencial de aplicação do entrecruzamento enzimático, uma alternativa encontrada à cristalização das enzimas é a agregação físicas dessas enzimas entrecruzadas, o que originou os agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) (Telekar *et al*, 2013).

A avaliação do procedimento de imobilização pode ser realizada de três formas: rendimento, eficiência e atividade recuperada, conforme as equações 1 a 3 descritas a seguir (Sheldon e van Pelt, 2013).

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Atividade imobilizada}}{\text{Atividade inicial}} \times 100 \quad (1)$$

A atividade imobilizada é definida como a diferença entre a atividade inicial e atividade da solução após a imobilização.

$$\text{Eficácia (\%)} = \frac{\text{Atividade observada}}{\text{Atividade imobilizada}} \times 100 \quad (2)$$

A atividade observada é definida como a atividade da enzima imobilizada.

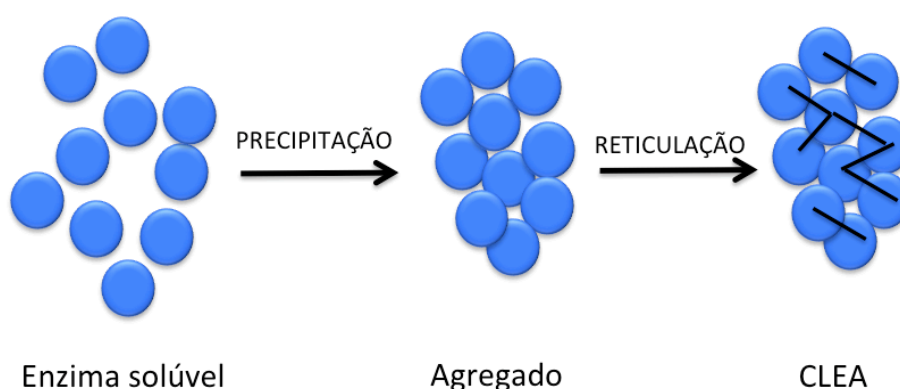
$$\text{Atividade Recuperada (\%)} = \text{Rendimento} \times \text{Eficácia} = \frac{\text{Atividade observada}}{\text{Atividade inicial}} \times 100 \quad (3)$$

1.3.1 Preparação de CLEAs

A preparação dos CLEAs consiste em duas etapas: (i) a precipitação da enzima, e (ii) o entrecruzamento da enzima precipitada (Figura 3). Na primeira etapa, agregados enzimáticos são formados através da adição de um agente precipitante, fazendo com que as moléculas se unam por ligações não covalentes e precipitem mantendo sua estrutura terciária. Na segunda etapa, os agregados são entrecruzados quimicamente pela reação entre os resíduos de aminoácidos (principalmente lisina) da superfície das enzimas. Após o entrecruzamento químico, os agregados tornam-se permanentemente insolúveis, organizados em uma estrutura que retém certa atividade enzimática (Schovaart 2004; Telekar *et al*, 2013; Sheldon e Pelt, 2013). Após o entrecruzamento, o CLEA é separado do solvente por alguma operação unitária e lavado para remoção de resíduos de solvente ou agente entrecruzante e das enzimas que não se ligaram covalentemente ao agregado.

A atividade recuperada é um parâmetro fundamental na avaliação dos CLEAs (Telekar *et al*, 2013).

Figura 3: Esquema da produção de CLEAs.



Fonte: adaptado de TELEKAR *et al*, 2013.

Além disso, também é possível realizar a imobilização conjunta de duas ou mais enzimas, dando origem aos chamados combi-CLEAs, o que possibilita a ocorrência de reações em cascata. Os combi-CLEAs são preparados através da precipitação e entrecruzamento simultâneo de mais de uma enzima. As vantagens desse procedimento é a redução de operações unitárias envolvidas, menor uso de solventes, reatores menores, reações mais rápidas e maior rendimento (Telekar *et al.*, 2013).

1.3.2 Parâmetros relevantes para preparação de CLEAs

Para se produzir CLEAs com alta retenção de atividade enzimática e estabilidade operacional, alguns parâmetros importantes devem ser considerados: natureza da enzima, natureza e quantidade dos agentes precipitante e entrecruzante, pH, temperatura e tempo de entrecruzamento. Ainda, os procedimentos de lavagem e separação após a preparação do CLEA podem afetar a recuperação de atividade final.

Para que a reação de entrecruzamento seja efetiva, é necessário que a superfície da enzima apresente uma quantidade razoável de resíduos de aminoácidos livres para ligação. Enzimas com baixo conteúdo de resíduos de aminoácidos livres podem resultar em CLEAs frágeis e com baixa recuperação de atividade, devido a liberação de enzimas para o meio durante a reação. Além disso, nos casos em que os resíduos de aminoácidos influenciam na atividade da enzima, a atividade do CLEA pode ser reduzida devido o entrecruzamento (Lopez-Gallego *et al.*, 2005).

Para casos de enzimas com baixo teor de resíduo de aminoácido, algumas estratégias foram propostas, como (i) a adição de polímeros com alto teor de resíduos de aminoácidos ao meio reativo (Lopez-Gallego *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2005), e (ii) adição de albumina de soro bovino (BSA) (Cruz *et al.*, 2012; Shah *et al.*, 2006), para que haja o entrecruzamento entre o composto adicionado e a enzima. Essas estratégias foram bem sucedidas, apresentando maior retenção de atividade e maior estabilidade operacional. Entretanto, quando adicionado em quantidade excessiva o coadjuvante proteico pode prejudicar a recuperação da atividade, por

dificultar a mobilidade entre enzima e substrato e pela diluição da atividade catalítica (Dal Magro *et al.*, 2016a).

A precipitação da enzima é geralmente feita através da adição de um solvente orgânico, sais ou polímeros à solução aquosa da enzima. Contudo, se faz necessária uma etapa prévia de seleção do melhor agente precipitante, em termos de recuperação de atividade. Uma alta recuperação de atividade após a ressuspensão do precipitado não significa que o agregado entrecruzado apresentará o mesmo comportamento. Uma possível explicação para este fato é que a enzima precipita numa conformação inativa, mas que ao ser ressuspensa a atividade é recuperada. Entretanto, a forma entrecruzada apresenta a mesma conformação que a enzima precipitada, ou seja, com baixa atividade (Telekar *et al.*, 2013).

Uma grande variedade de agentes precipitantes pode ser utilizada para preparação de CLEAs que apresentam uma boa recuperação de atividade. Isso é possível devido às variações bioquímicas e estruturais de cada enzima. Dessa forma, é complicado de se fazer uma generalização quanto ao precipitante para a preparação de um CLEA com alta atividade tornando indispensável a etapa de seleção do agente precipitante. (Telekar *et al.*, 2013).

Além disso, a concentração do agente precipitante pode afetar a atividade recuperada. Normalmente, uma maior recuperação de atividade é observada quando se utilizam altas concentrações, pois a agregação e precipitação ocorre de forma mais rápida, evitando a desnaturação da enzima (Zhao *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2012).

O agente de entrecruzamento mais utilizado é o glutaraldeído, devido ao seu baixo custo, facilidade na manipulação e alta reatividade com grupamentos amino. Por outro lado, o glutaraldeído pode ter efeitos tóxicos. Por isso, algumas pesquisas foram desenvolvidas utilizando outros agentes entrecruzantes como para-benzoquinona, quitosana e L-lisina (Wang *et al.*, 2011; Arsenaut *et al.*, 2011; Ayhan *et al.*, 2012).

A dosagem de agente entrecruzante influencia na atividade recuperada, estabilidade operacional e morfologia do CLEA. Já foi observado que a atividade recuperada aumenta com o aumento da concentração de entrecruzante até um ponto ótimo, seguindo pela diminuição da atividade recuperada com o aumento da concentração (Telekar *et al.*, 2013). Para baixas concentrações de agente entrecruzante, as ligações entre enzima e o agente são insuficientes para formação

dos agregados, deixando muita enzima livre em solução. Já para altas concentrações, muitas ligações entre a enzima e o agente se formam, tornando o CLEA um agregado rígido, impedindo o acesso do substrato ao sítio ativo das enzimas imobilizadas no interior do agregado (Yu *et al.*, 2006).

O pH e temperatura durante o entrecruzamento podem afetar a recuperação da atividade do CLEA. A reatividade do glutaraldeído é melhor para pHs entre 7 e 9, quando é possível a formação de polímeros de glutaraldeído (Sulek *et al.*, 2011). Dessa forma, o espaçamento entre as moléculas entrecruzadas é maior, tendendo à produção de CLEA com maior recuperação de atividade. Quanto a temperatura de entrecruzamento, a maioria dos experimentos descritos na literatura são realizados a baixas temperaturas (4°C), entretanto, o tempo de reação é maior. Recomenda-se que a temperatura de entrecruzamento considere a estabilidade térmica da enzima livre (Telekar *et al.*, 2013).

O tempo da reação de entrecruzamento influencia na recuperação de atividade, assim como a concentração do agente entrecruzante (Majumder *et al.*, 2008). Em reações curtas, não há formação de ligações suficientes para obtenção de um CLEA instável. E, para tempos longos, muitas ligações se formam o que resulta num CLEA rígido.

Por fim, a etapa de separação e lavagem pode afetar a atividade do CLEA. Essas etapas são normalmente feitas através da centrifugação, o que pode comprimir a partícula de CLEA, diminuindo o tamanho dos poros e aumentando problemas de difusão de massa (Montoro-García *et al.*, 2010).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

2.1.1 Preparação enzimática

Novozym 33095 foi a preparação enzimática utilizada, doada pela Novozymes (Espanha), que tem o uso indicado para processamento de sucos de frutas, como maçã, pera, pêssego e uva. Segundo o fabricante, o preparado contém principalmente atividade de pectinálise e atividade secundária de poligalacturonase.

2.1.2 Suco de uva

Suco de uva da variedade Concord, após extração e sem nenhum tratamento, foi gentilmente doado por Vinícola Jolimont (Canela, RS).

2.1.3 Farinha de pena

A farinha de pena utilizada foi obtida através da cocção sob pressão e moagem, com teor mínimo de 80% de proteína bruta.

2.1.4 Reagentes

Os reagentes utilizados para as diversas análises foram os seguintes: pectina (75% grau de esterificação), ácido poligalacturônico, ácido galacturônico e albumina bovina (BSA), adquiridos da Sigma Aldrich Co. Ltd. (São Paulo, Brasil). Todos os outros solventes e produtos químicos foram de grau analítico.

2.2 PREPARAÇÃO DE COMBI-CLEAS

A preparação de combi-CLEAs para os ensaios foi feita através do procedimento proposto por Schovaart (2004), com modificações. Em um tubo de 2 mL, o preparado enzimático e glutaraldeído foram adicionados conforme concentrações descritas no item 2.2.2, tampão de citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) foi adicionado em quantidade suficiente para completar o volume para 150 µL e, então, foram adicionados 850 µL de agente precipitante. O tubo foi agitado suavemente em homogeneizador de rolos horizontais, a temperatura ambiente, por tempo pré-estabelecido para cada ensaio. Após tempo de reação, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 5000 rpm (centrífuga MiniSpin® - Eppendorf) para a remoção do agente precipitante (sobrenadante). Os combi-CLEAs foram lavados com tampão de citrato de sódio (50 mM, pH 4,8), seguido de centrifugação por 3 min a 5000 rpm (centrífuga MiniSpin® - Eppendorf) e remoção do sobrenadante. Esse procedimento foi repetido três vezes. Por fim, os combi-CLEAs foram ressuspensos em 1 mL de tampão de citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) e armazenados a 4 °C até momento da análise.

2.2.1 Seleção do agente precipitante

A fim de escolher o melhor agente precipitante para a preparação dos combi-CLEAs, quatro solventes orgânicos foram avaliados: acetona, etanol, iso-propanol e terc-butanol. A influência de cada agente precipitante foi avaliada através da porcentagem de atividade de pectinase total recuperada, conforme a Equação 4 a seguir.

$$RA(\%) = \frac{\text{Atividade de pectinase total do CLEA } (U)}{\text{Atividade de pectinase total inicial } (U)} \times 100 \quad (4)$$

A preparação dos combi-CLEAs foi feita conforme o procedimento anteriormente descrito. O teor de proteína utilizado foi de 4 mg.mL⁻¹, a concentração de glutaraldeído foi de 220 mM e o tempo de reação foi de 3 h.

2.2.2 Planejamento experimental para otimização da preparação de combi-CLEAs

A fim de obter as condições ótimas para a preparação dos combi-CLEAs foi realizado um planejamento fatorial 2^3 , com três variáveis. As variáveis analisadas foram: tempo de entrecruzamento (h), concentração de proteína (mg.mL^{-1}) e concentração de glutaraldeído (mM). A variável de resposta avaliada foi a atividade recuperada. O planejamento consistiu em oito pontos fatoriais e três repetições no ponto central, num total de onze experimentos, conforme Tabela 1. O agente precipitante utilizado foi etanol.

Tabela 1: Planejamento experimental para otimização do preparado de combi-CLEAs

Experimento	X1	X2	X3
	Tempo (h)	Glutalaldeído (mM)	Proteína (mg.mL^{-1})
1	- 1 (1,5)	- 1 (110)	- 1 (0,4)
2	- 1 (1,5)	- 1 (110)	1 (1,0)
3	- 1 (1,5)	1 (290)	- 1 (0,4)
4	- 1 (1,5)	1 (290)	1 (1,0)
5	1 (5)	- 1 (110)	- 1 (0,4)
6	1 (5)	- 1 (110)	1 (1,0)
7	1 (5)	1 (290)	- 1 (0,4)
8	1 (5)	1 (290)	1 (1,0)
9	0 (3,3)	0 (200)	0 (0,7)
10	0 (3,3)	0 (200)	0 (0,7)
11	0 (3,3)	0 (200)	0 (0,7)

Fonte: O Autor (2016).

2.2.3 Preparação de combi-CLEAs com BSA e FP

Combi-CLEA-BSA e combi-CLEA-FP foram preparados conforme procedimento descrito acima, com adição de diferentes concentrações de BSA e farinha de pena, nas condições ótimas de tempo, concentração de glutaraldeído e

concentração de proteína indicadas pelo planejamento experimental, utilizando etanol como agente precipitante.

As concentrações de BSA e FP foram proporcionais ao teor de proteína oriunda do preparado. Para o BSA, as razões mg proteína:mg BSA utilizadas foram as seguintes: 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5. Para a farinha de pena foram utilizadas as seguintes razões mg proteína:mg FP: 1:1, 1:4, 1:7, 1:10, 1:15 e 1:20.

A fim de avaliar o efeito da farinha de pena na leitura da atividade dos combi-CLEAs, foram preparados tratamentos controle sem adição do preparado enzimático para cada uma das dosagens de FP.

2.2.4 Determinação da temperatura ótima

A temperatura ótima da atividade de pectinase total para enzima livre, combi-CLEA, combi-CLEA-BSA e combi-CLEA-FP foi determinada através da avaliação da atividade em diferentes temperaturas (40 a 70 °C), com pH constante (4,8), seguindo o procedimento descrito a seguir (2.4.1).

2.2.5 Determinação do pH ótimo

O pH ótimo da atividade de pectinase total para enzima livre, combi-CLEA, combi-CLEA-BSA e combi-CLEA-FP foi determinado através da avaliação da atividade em diferentes pHs (3 a 5), na temperatura ótima (60 °C), seguindo o procedimento descrito a seguir (2.4.1).

2.2.6 Avaliação da estabilidade térmica

A estabilidade térmica do preparado enzimático e dos CLEAs foi avaliada conforme procedimento descrito por Lorenzoni (2014), com modificações. A amostra foi incubada em tampão de citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) a 50 °C e 60 °C por um período total de 10 min. Periodicamente, alíquotas foram retiradas para

determinação de atividade de pectinase total. A inativação térmica foi descrita pela Equação 5.

$$\frac{A}{A_0} = \exp(-kt) \quad (5)$$

Onde: A é a atividade enzimática no tempo t, A₀ é atividade no tempo zero, t é o tempo de tratamento e k é a taxa de inativação constante na temperatura estudada.

O tempo de meia vida representa o tempo necessário para que a enzima perca 50 % de sua atividade inicial, calculada através da Equação 6.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (6)$$

2.2.7 Estabilidade operacional

A estabilidade operacional dos combi-CLEA, combi-CLEA-FP e combi-CLEA-BSA foi avaliada conforme método proposto por Dal Magro (2016).

Para os experimentos, 2 U de pectinase total foram adicionados a 1 mL de substrato (pectina 1 g.L⁻¹, em tampão de citrato de sódio – 50 mM e pH 4,8) e incubados a 37 °C por 15 min, sob agitação. Após tempo de reação, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 3000 rpm (centrífuga MiniSpin® - Eppendorf) a fim de separar os CLEAs do substrato. Então, os CLEAs recuperados foram incubados em 1 mL de substrato, para início de um novo ciclo. Após cada ciclo, foi determinada a concentração de produto formado através da curva de glicose, entre 0,2 e 1,2 mg.L⁻¹, quantificadas pelo método de ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). A quantidade de substâncias redutoras liberados no primeiro ciclo foi definida como referência de atividade máxima para os demais ciclos.

2.3 CLARIFICAÇÃO DE SUCO DE UVA

Para a clarificação do suco de uva, foram utilizados o preparado enzimático e os combi-CLEAs preparados diluídos em tampão de citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) de forma a padronizar a atividade de pectinase total em 5 U.

O procedimento utilizado foi o seguinte: em um tubo foram adicionados 1 mL de suco de uva e a amostra (enzima livre ou preparados imobilizados), e incubado a 40 °C por uma hora. Após, procedeu-se a análise de turbidez de amostra. Um tratamento controle, sem adição da enzima, foi realizado para avaliação da redução da turbidez das amostras testadas.

A avaliação do experimento foi feita através da redução da turbidez relativa. A redução na turbidez (%) é obtida através da razão entre a absorbância da amostra e do tratamento controle.

2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

2.4.1 Determinação da atividade de pectinase total (PE)

A atividade de pectinase total foi determinada pela liberação de substâncias redutoras pela reação de hidrólise de solução de pectina, quantificadas pelo método de DNS (Miller, 1959).

Para a análise, em um tubo de ensaio foram adicionados 0,1 mL de preparação enzimática diluída e 0,9 mL de substrato (pectina 1 g.L⁻¹, em tampão de citrato de sódio – 50 mM e pH 4,8), e incubado a 37 °C por 1 min, sob agitação. Após reação de hidrólise, foi adicionado 1 mL de DNS e incubado a 100 °C por 5 min, sendo imediatamente resfriado em banho de gelo. A amostra então foi lida em espectrofotômetro, a 540 nm, contra uma amostra de controle preparada sem enzima, submetida ao mesmo procedimento.

Os valores de absorbância encontrados foram convertidos em concentrações através da curva de calibração construída com soluções de glicose, entre 0,2 e 1,2 mg.L⁻¹. Uma unidade de pectinase total (PE) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de grupos redutores por minuto, nas

condições da reação e expressa em unidades/mL ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$). A atividade de pectinase total foi calculada pela Equação 4.

$$U/\text{mL} = \frac{C \times v_f \times f_{dil}}{t \times v_e} \quad (4)$$

Onde: C é a concentração de grupos redutores liberados ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$), v_f é o volume final da reação (mL), f_{dil} é o fator de diluição da enzima, t é o tempo de reação (min) e v_e é o volume de enzima adicionado (mL).

2.4.2 Quantificação de proteínas

O teor de proteínas total do preparado foi determinado pelo método de Bradford, que utiliza o corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250.

Em um tubo de ensaio foram adicionados 20 μL do preparado diluído e 1 mL do reagente de Bradford. Após 5 min, necessários para estabilização da cor, foi realizada a leitura em espectrofotômetro, a 595 nm, contra um controle preparado com água destilada, submetido ao mesmo procedimento.

Os valores de absorvância encontrados foram convertidos em concentrações através de uma curva de calibração construída com soluções BSA (padrão de proteína, albumina do soro bovino), entre 0,1 e 1,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os resultados foram expressos em $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de albumina.

2.4.3 Determinação da turbidez

A turbidez dos sucos foi medida através da luz dispersa por espectrofotometria, como proposto por Anderson (2005), com modificações.

O suco de uva bruto 1 mL foi misturado com a enzima (5 U, enzima livre ou preparados imobilizados) e colocados a 37 °C por 60 min. Ao final, a amostra foi centrifugada por 2 min a 5000 $\times g$ e lida em espectrofotômetro, a 860 nm. A % de clarificação foi determinada através da diferença entre a turbidez inicial e final.

2.5 ANÁLISES DE DADOS

Para execução do planejamento experimental e análise de resultados foi utilizado o software Statistica 12 (StatSoft); Para a comparação de médias foi utilizado o teste t de Student, utilizando o Microsoft Excel 2010 (Microsoft).

3 RESULTADOS

Effect of feather meal as proteic feeder on combi-CLEAs preparation for grape juice clarification

Daniela Goetze¹, Eliara F. Foletto, Halisson B. da Silva¹, Vitória C. C. Silveira¹,
Lucas Dal Magro¹, 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.

* Corresponding author:

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

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

Abstract

This work describes the preparation and optimization of combi-CLEAs of pectinases using feather meal as novel proteic feeder, for application on grape juice clarification. Initially, four solvents were tested as precipitant agents and ethanol was chosen as the best solvent. Subsequently, a 2³ factorial design was carried out to define the optimal conditions for combi-CLEAs preparation, which were set as 110 mM of glutaraldehyde, 0.66 mg protein.mL⁻¹ of enzymatic preparation and 5 h of reaction. Then, the effect of BSA and feather meal (FM) as proteic feeders was evaluated. Combi-CLEAs, combi-CLEAs-BSA and combi-CLEAs-FM were evaluated by their activity recovery, optimal conditions of pH and temperature, operational and thermal stabilities and effectiveness on juice clarification. The addition of feather meal had a positive impact on activity recovery, thermal stability and effectiveness on juice clarification, while the addition of BSA had a positive impact on operational and thermal stabilities.

Keywords: immobilization, pectinases, feather meal, clarification, grape juice

1. INTRODUCTION

Commercial enzymes are used on grape juice processing to reduce turbidity and viscosity, but they also improve the extraction of compounds responsible for the colour and flavor (Roldán *et al.*, 2006; Mieszczakowska-Frac *et al.*, 2012; Sandri *et al.*, 2011; Landbo *et al.*, 2007; Arneos and Meyer, 2010; Çinar, 2005). Generally, commercial enzymes are mixtures of polygalacturonase, pectinlyase, pectin esterase, cellulases and hemicellulases, which act together to hydrolyze a wide range of polysaccharides. For the clarification process, pectinases are more interesting, because the turbidity is linked with presence of pectic substances in suspension (Roldán *et al.*, 2006; Arneous and Meyer, 2010; Mieszczakowska-Frac *et al.*, 2012).

Thus, in order to improve enzymatic processes in industry, enzyme immobilization has used as a strategy to allow multiples reuses and also improve storage and operational stabilities. Essentially, there are three general methods to immobilize enzymes: binding to a support, entrapment and cross-linking. However, immobilization in a solid support has a high cost, because the supports are usually expensive. Also, the effective activity is diluted due to the addition of a large portion of non-catalytic mass. So, the cross linking strategy emerge as an alternative to overcome this problems (Sheldon and van Pelt, 2013).

Cross-linked enzymes aggregates (CLEAs) are carrier-free immobilized enzymes. This methodology consists of precipitating the enzyme and cross-linking it to form an aggregate (Sheldon, 2011). Also, this approach enables the co-immobilization of more than one enzyme, forming combi-CLEAs, that allows catalytic cascade process (Telekar *et al.*, 2013).

Many factors influence the effectiveness of this process, such as nature of enzymes, nature and amount of precipitant agent, nature and amount of cross-linker, time of precipitation and cross-linking and final steps of washing and separation (Telekar *et al.*, 2013). As all these factors can influence the preparation of CLEAs, the optimization of this procedure is complex and it can be quite time consuming. When each variable is studied at a time, the interaction among them might be ignored (Cruz *et al.*, 2012). So, it is recommended to use the response surface methodology (RSM) to assess these many variables and optimize preparation process of CLEAs (Cruz *et al.*, 2012; Morales *et al.*, 2015; Dal Magro *et al.*, 2016a).

The cross-linking step needs special attention, as it influences the activity, stability and particle size of resulting CLEAs (Sheldon, 2011). The most common cross-linker used is glutaraldehyde, because it is inexpensive, easily handle and capable to bind with different enzymes (Barbosa *et al*, 2014). There is an optimal concentration of cross-linker for each enzyme, since enzymes surface have different amounts of lysine residues. For enzymes with low amino group residues in their surface, an alternative to improve the cross-linking is the addition of substances that have high amounts of amino groups, such as polyethyleneimine (PEI) and bovine serum albumin (BSA) (Lopez-Gallego *et al*, 2005; Wilson *et al* 2005; Cruz *et al*, 2012; Shah *et al*, 2006).

Feather meal (FM) is an industrial residue that is obtained by cooking feathers under pressure, gridding and drying. Mostly, it is used to animal feeding or organic fertilizer. Although it has a high total protein quantity, the bioavailability is low because it is rich in keratin, a structural protein (Sinhorini, 2013). Feather meal could be used as proteic feeder for CLEAs preparation to increase the availability of amino group for cross-linking as it has high protein content. Also, the feather meal can resemble a support, due to structural feature of keratin.

Considering all these aspects, our objective was to verify the possibility of using feather meal as proteic feeder for the combi-CLEAs preparation of pectinases for the application on grape juice clarification. Initially, we performed a screening of precipitant agent, with four organic solvents, assessing the activity recovery in final CLEAs. For combi-CLEAS optimization process, a 2³ factorial design was performed varying the reaction time, enzyme concentration and glutaraldehyde concentration. Additionally, we evaluated the effect of different concentrations of BSA and FM on the activity recovery of combi-CLEAs. Finally, optimal pH and temperature, operational and thermal stabilities and the effect on juice clarification were determined for combi-CLEA, combi-CLEA-BSA and combi-CLEA-FM.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Novozym 33095 was kindly donated by Novozymes (Spain). Raw grape juice was donated by Vitivinícola Jolimont (Brazil). Feather meal with at least 80 % of raw protein was from poultry processing industry and used without any treatment. Apple

pectin, polygalacturonic acid, galacturonic acid and bovine serum albumin were from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). All the other reagents were of analytical grade.

2.2. Determination of enzyme activities

The enzymatic activity of total pectinase was measured as proposed by Dal Magro *et al.* (2016b).

2.3. Combi-CLEA preparation

For the preparation of different combi-CLEAs was followed a general procedure adapted from Schovaart (2004). The enzymatic preparation and glutaraldehyde (mM) were mixed according to the concentration of the experimental design. After that, citrate buffer (50 mM, pH 4.8) was added to complete the volume up to 150 μ L. Then, 850 μ L of precipitant agent were added. The mixture was placed in a roller mix at room temperature (+/- 20 °C) for a determined period of time. Combi-CLEAs were centrifuged in order to remove the precipitant agent, then washed 3-times with citrate buffer (50 mM, pH 4.8) and stored at 4 °C. Combi-CLEAs were evaluated for its activity recovery (%), calculated as follows:

$$AR(\%) = \frac{\text{Total pectinase activity in combi} - \text{CLEA (U)}}{\text{Initial pectinase activity(U)}} \times 100$$

2.4. Screening of precipitant agents

The effect of different precipitant agents on activity recovery of combi-CLEAs was evaluated. Combi-CLEAs were prepared as described in section 2.3 using acetone, ethanol, isopropanol or tert-butanol as precipitant agent. The time (3 h), concentration of the enzymatic preparation (0.4 mg of protein.mL⁻¹) and glutaraldehyde (220 mM) were kept constant for all experiments.

2.5. Optimization of combi-CLEA preparation

A 2^k factorial design with three variables was carried out in order to determine the optimal conditions for combi-CLEAs preparations. Enzymatic preparation concentration (0.4 to 1.0 mg of protein.mL⁻¹), glutaraldehyde concentration (110 to 290 mM) and time (1.5 to 5 h) were evaluated, as shown in Table 1. Combi-CLEAs

were prepared as described in section 2.3, using ethanol as the precipitant agent for all experiments.

2.6. Effect of BSA and FM as proteic feeder

Combi-CLEA-BSA and combi-CLEA-FM were prepared as described on section 2.3, with the addition of different concentrations of BSA (0.33 to 2.4 mg.mL⁻¹) or feather meal (0.33 to 13.2 mg.mL⁻¹). Enzymatic preparation concentration (0.66 mg of protein.mL⁻¹), glutaraldehyde concentration (110 mM), time (5 h) and precipitant agent (ethanol) were kept constant for all experiments.

2.7. Thermal stability

Thermal stability of soluble enzyme, combi-CLEA, combi-CLEA-BSA and combi-CLEA-FM were analyzed by incubating in citrate buffer (50 mM, pH 4.8) at 50 and 60 °C, as described by Lorenzoni (2014). Periodically, samples were taken to analyse total pectinase activity. The thermal inactivation was described by a first order reaction:

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

Where A is the enzyme activity at time t, A₀ is the initial enzyme activity, k is the inactivation constant and t is the treatment time. The half-life (t_{1/2}) was calculated through the k values, according to the equation:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

2.8. Optimal pH and temperature

Optimal pH and temperature conditions of soluble enzyme, combi-CLEA, combi-CLEA-BSA and combi-CLEA-FM were determined by analyzing the total pectinase activity. Temperature varied from 30 to 70 °C, at pH 4.8 whereas pH varied from 3.5 to 5 at 60 °C.

2.9. Operational stability

Operational stabilities of combi-CLEA, combi-CLEA-BSA and combi-CLEA-FM were evaluated for pectin hydrolysis, as described by Dal Magro *et al* (2016a). 2 U of

total pectinase of each CLEA were added to 1 mL of substrate (pectin 1 g.L⁻¹ in citrate buffer – 50 mM, pH 4.8) and incubated at 37 °C for 15 min. The CLEAs were separated by centrifugation (3000 x g, 5 min) and fresh substrate was added to start a new cycle. The concentration of product formed after each cycle was determined by DNS method, as suggested by Miller (1959). The concentration of the first cycle was considered to be the reference (100%) for the following cycles.

2.10. Juice clarification

Soluble enzyme, combi-CLEA, combi-CLEA-BSA and combi-CLEA-FM were diluted on citrate buffer (50 mM, pH 4.8) in order to standardize the total pectinase activity at 5 U. The juice clarification was carried out as reported by Dal Magro *et al* (2016a), which evaluates the clarification in terms of turbidity reduction.

2.11. Statistical analysis

The software Statistica 12 (StatSoft) was used to carry out the experimental design and analyse the results. Student's t-test was used to verify the significance of the difference between samples, using software Microsoft Excel 2010 (Microsoft).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Screening of precipitant agents

The precipitant agent plays an important role in activity recovery of CLEAs. It is essential that during precipitation, the enzyme keep its supramolecular structure that will after be cross-linked to form the CLEAs (Telekar *et al*, 2013). Schoevaart *et al* (2004) analyzed several precipitant agents for different enzymes and found some activity recoveries even higher than 100 %. However, the authors just considered the activity recovery after precipitation and resuspension in buffer. This approach does not consider that during precipitation the enzyme can lost its activity that will be recovered after resuspension in buffer, but will not be recovered once the enzyme is cross-linked in the precipitated form. So, when selecting the precipitant agent, it is interesting to analyze the activity recovery after the cross-linking step.

As presented in Figure 1, the four precipitant agents tested showed very low activities recovery, with similar values. This result could be related with the reaction conditions (glutaraldehyde concentration, enzymatic preparation concentration and time) that might be far from ideal conditions. Better results can be achieved by

running a full experimental design for different solvents, as performed by Morales *et al* (2015).

Although tert-butyl alcohol had the highest activity recovery, it has some operational limitation, such as it is solid state at room temperature. On the other hand, ethanol had the lowest recovery, but it is a low cost solvent, easily found for bench-scale experiments and it is from renewable sources. Then, ethanol was chosen as precipitant agent for further experiments.

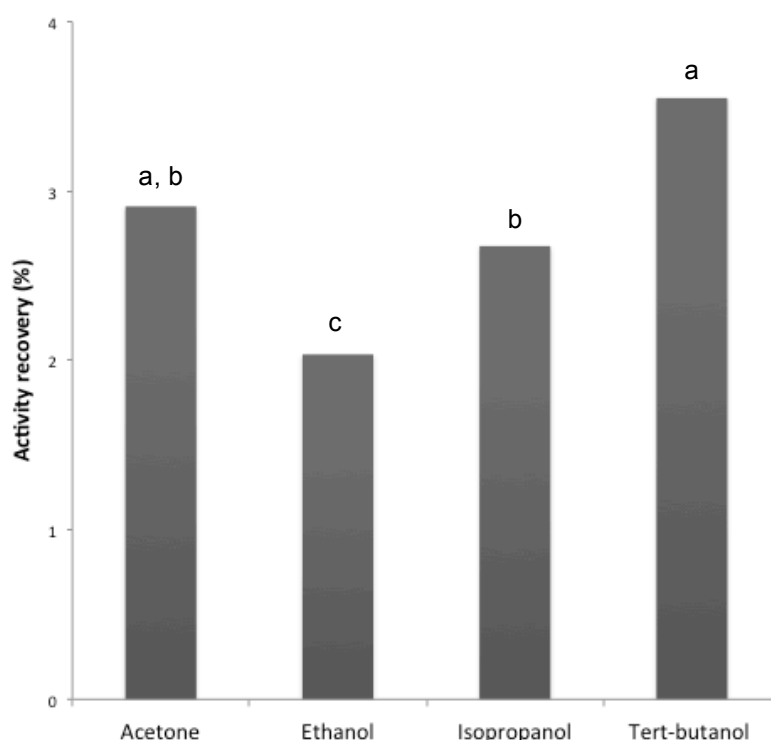


Figure 1: Effect of different precipitant agents on combi-CLEAs' activity recovery. Data with same letter are not statistically different.

3.2. Optimization of combi-CLEA preparation

As many factors impact the activity recovery of CLEA, the effect of time (h), enzymatic preparation concentration (mg of protein.mL⁻¹) and glutaraldehyde concentration (mM) were studied using a 2³ factorial design in order to find the best conditions for CLEA preparation.

Through the data analysis ($R^2 = 0.9850$) it was found that the linear effect of the variables as well as the effect of their interactions were statistically significant on the activity recovery, as can be seen in Table 2 ($p < 0.05$). The time has a positive

effect while glutaraldehyde concentration and enzymatic preparation concentration presented negative effect.

Table 1: Experimental design and results of activity recovery of CLEA

Experiments	X1 Time (h)	X2 Glutaraldehyde (mM)	X3 Enzymatic Preparation (mg of protein.mL ⁻¹)	Activity recovery (%)
1	- 1 (1.5)	- 1 (110)	- 1 (0.4)	1.6
2	- 1 (1.5)	- 1 (110)	1 (1.0)	1.4
3	- 1 (1.5)	1 (290)	- 1 (0.4)	3.7
4	- 1 (1,5)	1 (290)	1 (1.0)	3.3
5	1 (5)	- 1 (110)	- 1 (0.4)	6.1
6	1 (5)	- 1 (110)	1 (1.0)	4.2
7	1 (5)	1 (290)	- 1 (0.4)	2.6
8	1 (5)	1 (290)	1 (1.0)	2.0
9	0 (3.3)	0 (200)	0 (0.7)	3.1
10	0 (3.3)	0 (200)	0 (0.7)	3.5
11	0 (3.3)	0 (200)	0 (0.7)	4.1

Table 2: Statistical analysis of experimental design

Factor	Effect	p
Mean	3.129	< 0.0001
X1	1.229	0.0010
X2	-0.386	0.0099
X3	-0.781	0.0024
X1X2	-2.427	0.0002
X1X3	-0.459	0.0070
X2X3	0.273	0.0195

The interaction between the variables can be better understood examining the plots in Figure 2. Analyzing the interaction between time and glutaraldehyde concentration (Figure 2a), when glutaraldehyde concentration was kept on its low level, activity recovery increased at longer reaction time. However, when glutaraldehyde concentration was kept on its high level, activity recovery reduced as the time increased. Dal Magro et al (2016a) found the same behavior for the effects of time and glutaraldehyde concentration on CLEA of pectinases using Rohapect® 10L. The concentration of crosslinking agent is an important parameter during CLEA preparation, because it is important that during the reaction time a sufficient amount of bonds between proteins should be formed, to achieve a steady and porous

aggregate. However, for higher enzyme concentrations or longer reactions times the bonds between protein and glutaraldehyde may be too strong, forming a rigid aggregate, that might have diffusional issues, restraining the contact between substrate and enzyme.

Looking at the relationship between glutaraldehyde concentration and enzymatic preparation concentration (Figure 2b), the activity recovery was always lower when the concentration of glutaraldehyde was on its high level, and this was more pronounced at the low protein concentration. Finally, considering the interaction between time and enzymatic preparation concentration (Figure 2c), the activity recovery was always higher when the reaction time was longer, and as mentioned before, at low protein concentration the increase in reaction time promoted a higher increase in activity recovery.

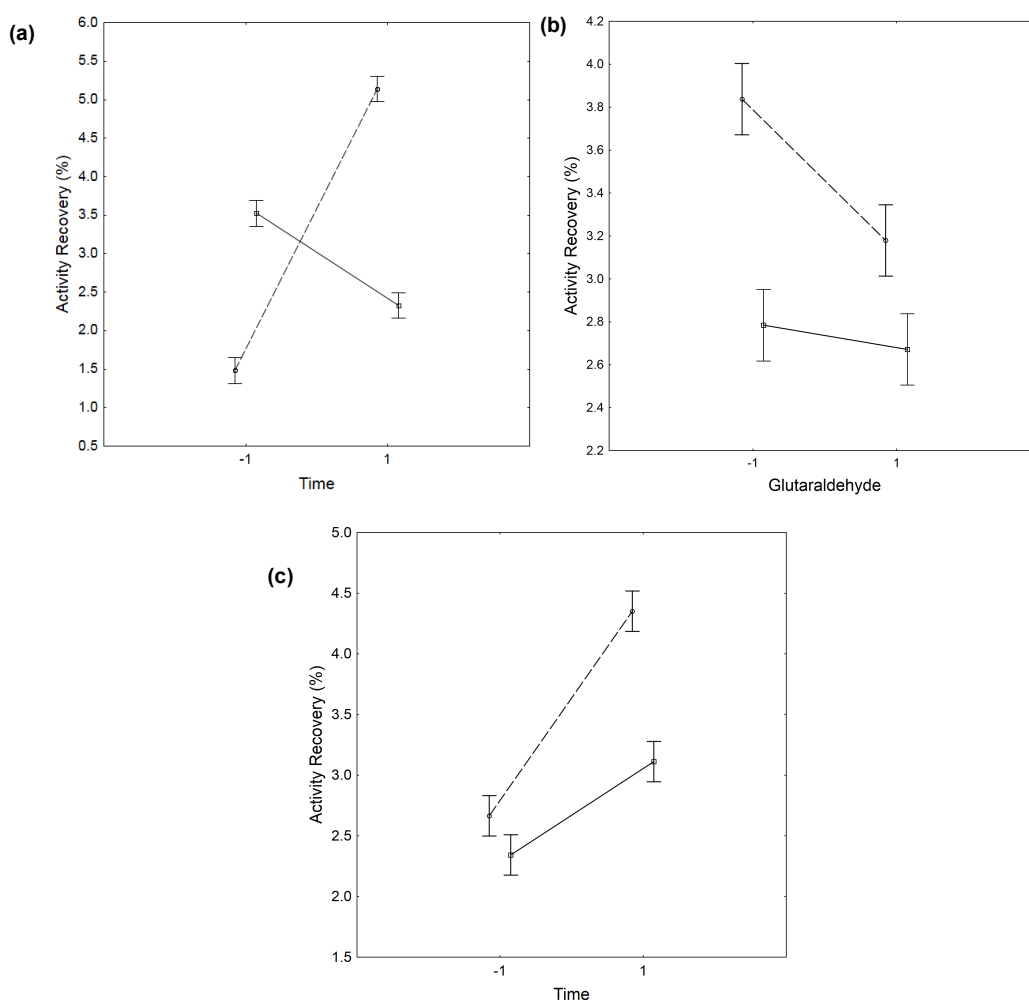


Figure 2: Interaction between (a) time and glutaraldehyde concentration, (b) glutaraldehyde concentration and enzymatic preparation and (c) time and enzymatic preparation (for all figures: level -1: dashed line; level 1: continuous line)

Using the response desirability profiling, the best conditions for CLEA preparation were: concentration of glutaraldehyde (110 mM), enzyme concentration ($0.66 \text{ mg protein.mL}^{-1}$) and 5 h. Under these conditions it was achieved 5.1 % of activity recovery and a CLEA with 3,3 U/mL.

3.3. Effect of BSA and FM as proteic feeder

After the determination of the optimal parameters for combi-CLEA preparation, different concentrations of BSA or FM were tested as proteic feeder under these conditions, aiming to improve activity recovery. BSA is known to help activity recovery, due to the high amount of lysine residues in its surface (Sheldon, 2011; Cruz *et al*, 2012; Dal Magro, 2016a). Feather meal is an industrial residue rich in keratin, a protein that has an important structural role. Keratin has a high amount of cysteine in its surface (Sinhorini, 2013). The usage of proteic feeders benefits the cross-linking step by increasing the available groups to bind with the enzyme. So, better results in activity recovery can be achieved, due to reduction on diffusional limitations and increase on mechanical stability (Cruz *et al.*, 2012).

As can be seen in Figure 3 (a), FM enhanced the activity recovery to values around 10 %, when the amount of FM added was higher than 4.6 mg.mL^{-1} . However, concentrations above 4.6 mg.mL^{-1} did not show a significant increasing in activity recovery. BSA addition also had a positive effect in the activity recovery when the concentration added was 0.66 mg.mL^{-1} , as shown in Figure 3 (b). Other concentrations of BSA did not improve activity recovery when compared with combi-CLEAs prepared under optimal conditions. So, for next steps we decided to use 4.6 mg.mL^{-1} of feather meal for combi-CLEA-FM preparation and 0.66 mg.mL^{-1} of BSA for combi-BSA-FM preparation.

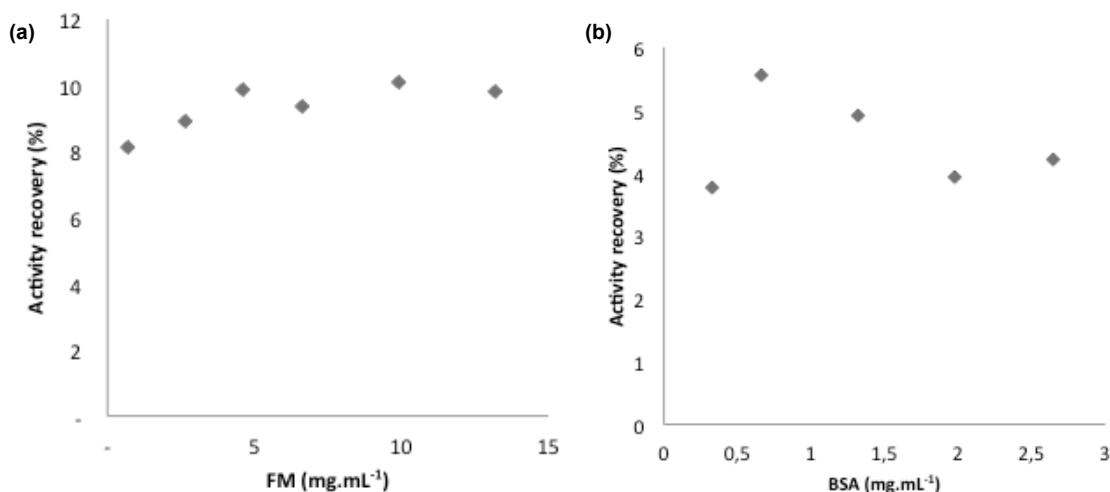


Figure 3: Effect of proteic feeders in combi-CLEAs preparation (a) FM and (b) BSA.

3.4. Thermal stability

Enzyme immobilization can enhance thermal stability under severe conditions of pH and temperature (Sheldon, 2011). As can be seen in Table 3, combi-CLEA-FM improved the stability on both temperature analyzed. On the other hand, combi-CLEA and combi-CLEA-BSA provided improvement on thermal stability only at 60 °C. It was expected that BSA addition would have a positive effect on thermal stability at both temperatures, but it could only be noticed at 60 °C. The multipoint interactions between proteins (enzymes and BSA) and glutaraldehyde in the combi-CLEAs preparation provided a confinement effect for protein configuration, which increase the enzyme stability (Dal Magro *et al.*, 2016a).

Table 3: Half-life of free enzyme, combi-CLEA, combi-CLEA-FM and combi-CLEA-BSA

	50°C			60°C		
	k (min ⁻¹)	t _{1/2} (min)	r ²	k (min ⁻¹)	t _{1/2} (min)	r ²
Free enzyme	0.131	5.29 ^b	0.975	1.434	0.48 ^c	0.973
Combi-CLEA	0.161	4.31 ^c	0.973	1.066	0.65 ^b	0.956
Combi-CLEA-FM	0.102	6.80 ^a	0.919	1.048	0.66 ^b	0.998
Combi-CLEA-BSA	0.319	2.17 ^d	0.999	0.599	1.15 ^a	0.923

In the same column, data with same letter are not statistically different.

3.5. Optimal pH and temperature

The immobilization can enhance many enzyme characteristics, however the optimal conditions of pH and temperature are usually the same from the free

enzyme. The enzyme used in this research has optimal activity between pH 3.5 and 4.2 and temperature up to 60 °C.

As can be seen in Figure 4(a), combi-CLEA, combi-CLEA-FM and combi-CLEA-BSA showed higher optimal temperature than the free enzyme. Also, the addition of protein feeders shifted the optimal temperature from 40 °C to 60 °C. Moreover, in between 40 °C and 70 °C, all samples kept at least 60 % of its maximum activity.

On the other hand, the optimal pH was the same for free enzyme and the three combi-CLEAs prepared, as shown in Figure 4(b). In the range between 3 and 4, which is similar from grape juice, combi-CLEA-FM and combi-CLEA-BSA presented more than 60 % of its maximum activity.

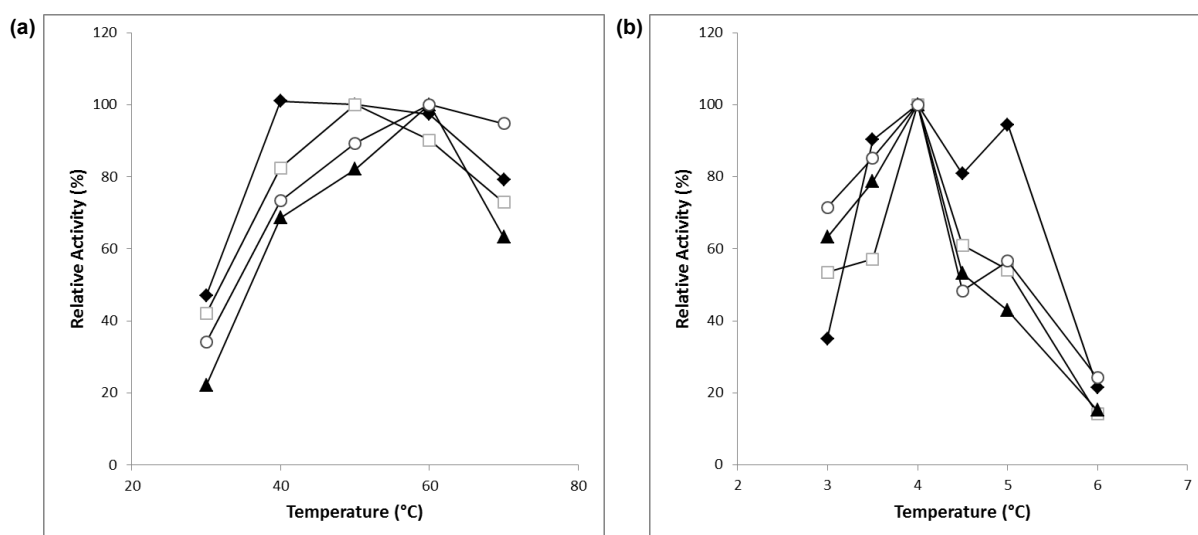


Figure 4: Relative activity of free enzyme (◆), combi-CLEA (□), combi-CLEA-FM (▲) and combi-CLEA-BSA (○) under different conditions of (a) Temperature and (b) pH.

3.6. Operational stability

Enzyme immobilization is performed aiming to achieve easy enzyme recovery after reaction and to allow subsequent reuse, which will reduce enzyme effective cost. CLEAs are design to be simply recyclable (Sheldon, 2011). To verify the reuse of prepared combi-CLEAs, seven cycles of pectin hydrolysis were conducted. As can be observed in Figure 5, all combi-CLEA lost its initial activity along the experiment. The significant loss of activity was observed until the fourth cycle, then, the loss reduced on lower rates and it seems to happen a sort of stabilisation after sixth cycle. The most satisfactory results were found to combi-CLEA-BSA, which lost its activity

on lower rates and after seven cycles still with 50 % of its initial activity. However, it was expected that combi-CLEAs kept 100 % of their activities at least in initial cycles, as found by Dal Magro *et al* (2016a) for combi-CLEA and combi-CLEA-BSA of pectinases using Rohapect® 10L, which 100 % of activity was kept for four cycles. Nevertheless, the loss in activity may happen due to issues on the recovery process of CLEAs that could lead reduce de amount of enzymes aggregates along the experiment.

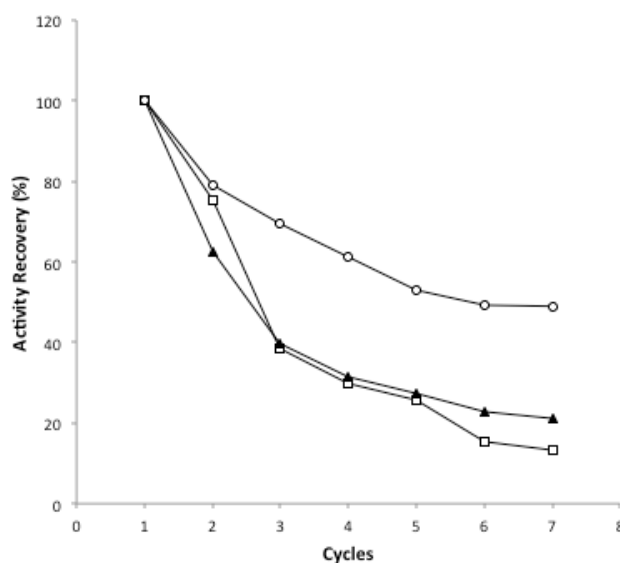


Figure 5: Reusability of combi-CLEA (◆), combi-CLEA-FM (○) and combi-CLEA-BSA (▲) for pectin hydrolysis

3.7. Juice clarification

Free enzyme and the CLEAs were used for grape juice clarification and the turbidity reduction was measured to assess the process. As shown in Figure 6, combi-CLEA and combi-CLEA-FM exhibited the highest turbidity reduction, 57.9 % and 56.7 % respectively, demonstrating their potential for application in industry. Although the combi-CLEA-BSA also showed a remarkable turbidity reduction (44.3 %), it was observed that after the process the typical juice color was lost, that is an important sensory characteristic.

Even though the amount of activity added was the same for all samples, the free enzyme showed the lowest turbidity reduction (35.3 %). A possible reason for this result is that the enzyme could lose its activity during the process. Therefore, it can also explain the highest turbidity reduction for the immobilized enzymes, once immobilization improves the enzyme stability.

Furthermore, the good results obtained with combi-CLEA and combi-CLEA-FM may be associated with cascade reactions. Due to immobilization, different enzymes are held together closely, making easier for a product of one enzymatic reaction to become the substrate of other reaction (Telekar *et al.* 2013). Also, the combi-CLEAs can be reused several times, making their use profitable.

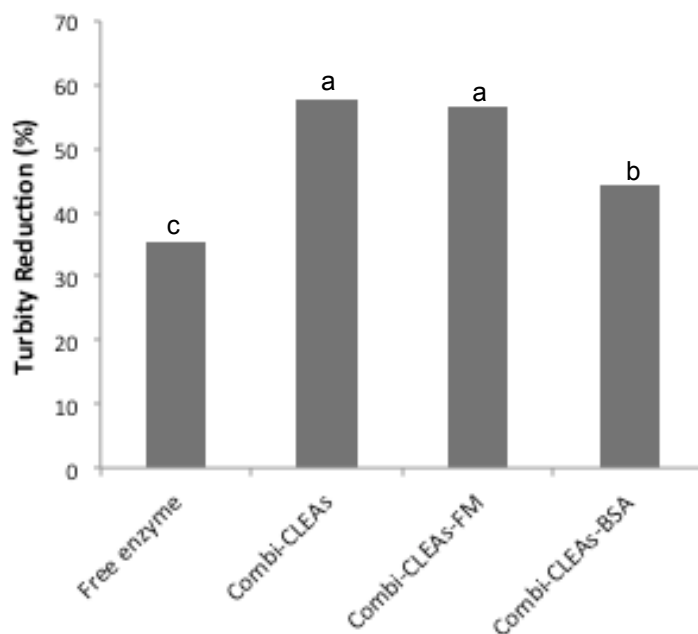


Figure 6: Effect of free enzyme, combi-CLEA, combi-CLEA-FM and combi-CLEA-BSA on grape juice clarification

4. CONCLUSIONS

In this work, we studied the CLEAs preparation of pectinases for juice clarification. For the first time in the literature, feather meal was applied as proteic feeder, and it was possible to improve the activity recovery using this inexpensive poultry byproduct comparing to the use of BSA, an usual proteic feeder. Additionally, combi-CLEA-FM presented higher thermal stability and most important, higher reduction of grape juice turbidity, especially when compared to free enzyme.

Since the addition of BSA also showed a positive effect on thermal and operational stabilities, the effect of combination addition of BSA and FM could be assessed in further steps. Moreover, to facilitate the recovery of combi-CLEAs after the reaction and to allow more cycles of reuse, magnetic particles could be added during the preparation procedure.

REFERENCES

Arnous, A; Meyer, A. S.. Discriminated release of phenolic substances from red wine grape skins (*Vitis vinifera* L.) by multicomponent enzymes treatment. **Biochemical Engineering Journal**, v49, p 68-77, 2010.

Barbosa, O.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, A.; Torres, R.; Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advances**, v. 4, p. 1583-1600, 2014.

Çinar, I. Effects of cellulase and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant carotenoids. **Process Biochemistry**, v40, p. 945-949, 2005.

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

Dal Magro, L.; Hertz, P. F.; Fernandez-Lafuente, R.; Klein, M. P.; Rodrigues, R. C.. Preparation and characterization of Combi-CLEAs from pectinases and celulases: a potential biocatalytic for grape juice clarification. **RSC Advances**, v6, p. 27242-27251, 2016a.

Dal Magro, L.; Goetze, D.; Ribeiro, C. T.; Paludo, N.; Rodrigues, E.; Hertz, P. F.; Klein, M. P.; Rodrigues, R. C. Identification of Bioactive Compounds From *Vitis labrusca* L. Variety Concord Grape Juice Treated With Commercial Enzymes: Improved Yield and Quality Parameters. **Food Bioprocess Technology**, v 9, p. 365-377, 2016b.

Landbo, A. K.; Kaarck, K.; Meyer, A. S.. Statistically designed two step response surface optimization of enzymatic prepress treatment to increase juice yield and

lower turbidity of elderberry juice. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v8, p.135-142, 2007.

López-Gallego, F.; Betancor, L.; Hidalgo, A.; Alonso, N.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. Co-aggregation of Enzymes and Polyethyleneimine: A simple Method To Prepare soluble and Immobilized Derivatives of Glutaryl Acylase. **Biomacromolecules**, v6, p. 1839-1842, 2005.

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

Mieszczakowska-Frac, M.; Markowski, J.; Zbrzezniak, M.; Plochanski, W. Impact of enzyme on quality of blackcurrant and plum juices. **LWT – Food Science and Technology**, v49, p. 251-256, 2012.

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

Morales, A.; Barbosa, O.; Rueda, N.; Fonseca, Z.; Torres, R.; Rodrigues, R. C.; Ortiz, C.; Fernandez-Lafuente, R.. Optimization and characterization of CLEAs of the very thermostable dimeric peroxidase from *Roystonea regia*. **RSC Advances**, v5, p. 53047-53053, 2015.

Roldán, A.; Palacios, V.; Peñate, X.; Benítez, T.; Pérez, L.. Use of *Trichoderma* enzymatic extracts on vinification of Palomino fino grapes in the sherry region. **Journal of Food Engineering**, v75, p. 375-382, 2006.

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

Schovaart, R.; Wolbers, M. W.; Golubovic, M.; Ottens, M.; Kiebiim, A. P. G.; van Rantwijk, F.; van der Wielen, L. A. M.; Sheldon, R. A.. Preparation, optimization, and

structures of Cross-linked enzyme Aggregates (CLEAs). **Biotechnology and Bioengineering**, v87, 754–762, 2004

Shah, S.; Sharma, A.; Gupta, M. N. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. **Analytical Biochemistry**, v351, p. 207-213, 2006

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

Sheldon, R. A.; Pelt, S. V.. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem Soc Rev**, v42, 6223-6235, 2013.

Sinhorini, M. R. **Processo de produção de farinha de penas hidrolisadas: estudos de otimização do teor protéico e do valor de digestibilidade da proteína.** 110p. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2013.

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

Wilson, L.; Illanes, A.; Abian, O.; Pessela, B. C. C.; Fernández-Lafuente, R.; Guisen, J. M. Co-Aggregation of Penicillin G Acylase and Polyionic Polymers: An Easy Methodology To Prepare Enzyme Biocatalysts Stable in Organic Media. **Biomacromolecules**, v5(3) p. 852–857, 2004.

4 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho teve como objetivo a preparação de combi-CLEAs de pectinases para clarificação de suco de uva. Algumas estratégias descritas na literatura foram utilizadas a fim de otimizar o procedimento de preparação de combi-CLEAs, entretanto a recuperação de atividade observada foi abaixo do esperado. Porém, a partir dos resultados obtidos foi possível perceber algumas tendências que podem de fato aumentar a atividade recuperada dos combi-CLEAs. A seguir, as conclusões deste trabalho são apresentadas juntamente com as perspectivas futuras para obtenção de melhores resultados.

O preparado enzimático utilizado neste trabalho tem uma composição complexa, dessa forma, um estudo mais aprofundado da estrutura dessas enzimas possibilitaria desenvolver estratégias de otimização, como condições de precipitação e entrecruzamento e adição de componentes ricos em grupamento amino, buscando preparar biocatalizadores mais eficientes. Além disso, apesar de estar dentro do período de validade, o preparado apresentou baixa estabilidade térmica, em desacordo com o informado pelo fabricante, indicando possível perda de propriedades ao longo do armazenamento.

Quanto a escolha do agente precipitante, uma estratégia mais adequada para avaliação dos solventes é realizar um planejamento experimental que envolva diferentes condições de tempo, concentração de agente precipitante e concentração de preparado enzimático e repeti-lo para todas as opções de solvente. Assim, os agentes precipitantes são avaliados em diversas condições, aumentando a possibilidade de encontrar condições ótimas de precipitação e entrecruzamento para cada um dos solventes testados. Dessa forma, a etapa de seleção de agente precipitante e determinação de condições ótimas são combinadas em apenas um experimento.

A adição de farinha de pena e albumina de soro bovino (BSA) apresentaram efeitos positivos na preparação de combi-CLEAs. A farinha de pena aumentou satisfatoriamente a atividade recuperada, bem como a estabilidade térmica e eficiência de clarificação. Já o BSA não teve efeito significativo sobre a recuperação de atividade, mas aumentou satisfatoriamente a estabilidade térmica e operacional dos combi-CLEAs preparados.

A farinha de pena se mostra uma alternativa interessante para a preparação de combi-CLEAs, pois além de ser um produto de baixo custo, possui altos teores de queratina. A queratina é uma proteína com características estruturais, o que pode atuar como uma espécie de suporte para as enzimas, formando uma estrutura porosa e com boa resistência mecânica. Uma possibilidade para trabalhos futuros é a adição combinada de BSA e farinha de pena, a fim de potencializar o efeito de cada um dos aditivos.

Com a imobilização de enzimas se espera alta capacidade de reuso. No entanto, os combi-CLEAs preparados não apresentaram boa recuperação. Um dos possíveis motivos para a perda de atividade ao longo dos ciclos pode estar relacionado com a etapa de separação entre combi-CLEAs e solução. Desta forma, uma alternativa para facilitar essa separação é a preparação de combi-CLEAs magnéticos, na qual partículas magnéticas são adicionadas na etapa de precipitação e entrecruzamento, sendo facilmente separados com a aplicação de um campo magnético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albersheim, P.; Killias, U. Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 97, p. 107-115, 1962.

Anderson, C. W. Turbidity. In **Techniques of Water-Resources Investigations**, Geological Survey (U.S.), v. 2.1, ch. A6, p. 55, 2005.

Arnous, A; Meyer, A. S.. Discriminated release of phenolic substances from red wine grape skins (*Vitis vinifera* L.) by multicomponent enzymes treatment. **Biochemical Engineering Journal**, v49, p 68-77, 2010.

Arsenault, A.; Cabana, H.; Jones, J. P. Laccase-Based CLEAs: Chitosan as a Novel Cross-Linking Agent. **Enzyme Research**, v2011, 2011.

Ayhan, H.; Ayhan, F.; Gulsu, A. Highly biocompatible enzyme aggregates crosslinked by L-lysine. **Turkish Journal of Biochemistry**, v37, p. 14-20, 2012.

Barbosa, O.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, A.; Torres, R.; Rodrigues, R. C.; Fernandez- Lafuente, R. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advances**, v. 4, p. 1583-1600, 2014.

BRASIL. Lei 8.918 Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de bebidas. Brasília, Distrito Federal.

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

Çinar, I. Effects of cellulase and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant carotenoids. **Process Biochemistry**, v40, p. 945-949, 2005.

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

Da-Silva, R.; Franco, C. M. L.; Gomes, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Bol. SBCTA**, v31 (2), p. 249-260, 1997.

Dal Magro, L.; Hertz, P. F.; Fernandez-Lafuente, R.; Klein, M. P.; Rodrigues, R. C.. Preparation and characterization of Combi-CLEAs from pectinases and cellulases: a potential biocatalytic for grape juice clarification. **RSC Advances**, v6, p. 27242-27251, 2016a.

Dal Magro, L.; Goetze, D.; Ribeiro, C. T.; Paludo, N.; Rodrigues, E.; Hertz, P. F.; Klein, M. P.; Rodrigues, R. C. Identification of Bioactive Compounds From *Vitis labrusca* L. Variety Concord Grape Juice Treated With Commercial Enzymes: Improved Yield and Quality Parameters. **Food Bioprocess Technology**, v 9, p. 365-377, 2016b.

Dal Magro, L. Influência da composição de diferentes preparados enzimáticos na extração, qualidade e compostos bioativos do suco de uva da variedade "concord". 169p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2016.

Dani, C. **Atividade biológica de diferentes sucos de uva e seus principais constituintes**. 208p. Tese de Doutorado. Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, 2008.

Dávalos, A.; Bartolomé, B.; Gómez-Cordovés, C.; Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. **Food Chemistry**, v93, p. 325-330, 2005.

Diano, N.; Grimaldi, T.; Bianco, M.; Rossi, S.; Gabrovska, K.; Yordanova, G.; Godjevargova, T.; Grano, V.; Nicolucci, C.; Mita, L.; Bencivenga, U.; Canciglia, P.; Mita, D. G. Apple Juice Clarification by Immobilized Pectolytic Enzymes in Packed or Fluidized Bed Reactors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v56, p.11471-11477, 2008.

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

IBRAVIN. Instituto Brasileiro do Vinho. **Projeto PULSE – Qual a batida do suco de uva 100% no coração do Brasil**. 2015.

Kashyap, D. R.; Vohra, P. K.; Chopra, S.; Tewari, R.. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v77, p. 215-227, 2001.

Keevil, J. G.; Osman, H. E.; Reed, J. D.; Folts, J. D.. Grape juice, but not Orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. **The Journal of Nutrition**, v22, p. 53-56, 2000.

Landbo, A. K.; Kaarck, K.; Meyer, A. S.. Statistically designed two step response surface optimization of enzymatic prepress treatment to increase juice yield and lower turbidity of elderberry juice. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v8, p.135-142, 2007.

López-Gallego, F.; Betancor, L.; Hidalgo, A.; Alonso, N.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. Co-aggregation of Enzymes and Polyethyleneimine: A simple Method To Prepare table and Immobilized Derivatives of Glutaryl Acylase. **Biomacromolecules**, v6, p. 1839-1842, 2005.

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

Majumder, A. B.; Mondal, K.; Singh, T. P.; Gupta, M. N. Designing cross-linked lipase aggregates for optimum performance as biocatalysts. **Biocatalysis and Biotransformation**, v26, p. 235-242, 2008

Mello, L. M. R. **Panorama da Viticultura Brasileira**. Available at <<http://www.uvibra.com.br/pdf/PanoramadaVitiviniculturabrasileira2014abr2015.pdf>> Access in 20/11/2016.

Mieszczakowska-Frac, M.; Markowski, J.; Zbrzezniak, M.; Plochanski, W. Impact of enzyme on quality of blackcurrant and plum juices. **LWT – Food Science and Technology**, v49, p. 251-256, 2012.

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

Montoro-García, S.; Gil-Ortiz, F.; Navarro-Fernandez, J.; Rubio, V.; Garcia-Carmona, F.; Sanchez-Ferrer, A. Improved cross-linked enzyme aggregates for the production of desacetyl β -lactam antibiotics intermediates. **Bioresources Technology**, v 101, p. 331-336, 2010.

Morales, A.; Barbosa, O.; Rueda, N.; Fonseca, Z.; Torres, R.; Rodrigues, R. C.; Ortiz, C.; Fernandez-Lafuente, R.. Optimization and characterization of CLEAs of the very thermostable dimeric peroxidase from *Roystonea regia*. **RSC Advances**, v5, p. 53047-53053, 2015.

Rizzon, L. A.; Meneguzzo, J. Suco de Uva. Brasília, Distrito Federal. Embrapa Informação Tecnológica, 2007

Roldán, A.; Palacios, V.; Peñate, X.; Benítez, T.; Pérez, L.. Use of *Trichoderma* enzymatic extracts on vinification of Palomino fino grapes in the sherry region. **Journal of Food Engineering**, v75, p. 375-382, 2006.

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

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

Schovaart, R.; Wolbers, M. W.; Golubovic, M.; Ottens, M.; Kiebiim, A. P. G.; van Rantwijk, F.; van der Wielen, L. A. M.; Sheldon, R. A.. Preparation, optimization, and structures of Cross-linked enzyme Aggregates (CLEAs). **Biotechnology and Bioengineering**, v87, 754–762, 2004

Shah, S.; Sharma, A.; Gupta, M. N. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. **Analytical Biochemistry**, v351, p. 207-213, 2006

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

Sheldon, R. A.; Pelt, S. V.. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem Soc Rev**, v42, 6223-6235, 2013.

Sinhorini, M. R. **Processo de produção de farinha de penas hidrolisadas: estudos de otimização do teor protéico e do valor de digestibilidade da proteína**. 110p. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2013.

Sulek, F.; Fernandez, D. P.; Knez, Z.; Habulin, M.; Sheldon, R. A. Immobilization of horseradish peroxidase as crosslinked enzyme aggregates (CLEAs). **Process Biochemistry**, v46, p. 765-769, 2011.

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

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

UVIBRA. União Brasileira de Vitinicultura. **Comercialização de Vinhos e derivados Elaborados de 2010 a 2015**. Available at <http://www.uvibra.com.br/pdf/comercializacao2010a2015_nov.pdf>. Access in 20/11/2016.

Wang, A.; Zhang, F.; Chen, F.; Wang, M.; Li, H.; Zeng, Z.; Xie, T.; Chen, Z. A facile technique to prepare cross-linked enzyme aggregates using *p*-benzoquinone as cross-linking agent. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v28, p.1090-1095, 2011.

Wilson, L.; Illanes, A.; Abian, O.; Pessela, B. C. C.; Fernández-Lafuente, R.; Guisen, J. M. Co-Aggregation of Penicillin G Acylase and Polyionic Polymers: An Easy Methodology To Prepare Enzyme Biocatalysts Stable in Organic Media. **Biomacromolecules**, v5(3) p. 852–857, 2004.

Xia, E. Q.; Deng, G. F.; Guo, Y. J.; Li, H. B.. "Biological Activities of Polyphenols from Grapes." **International Journal of Molecular Sciences**, v11(2): 622-646, 2010.

Yang, X.; Zheng, P.; Ni, Y.; Sun, Z.. Highly efficient biosynthesis of sucrose-6-acetate with cross-linked aggregates of Lipozyme TL 100 L. **Journal of Biotechnology**, v161, p.27-33, 2012.

Yu, H. W.; Chen, H.; Wang, X.; Yang, Y.Y, Ching, C. B.; **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v43, p. 124-127, 2006.

Zhao, L. F.; Zheng, L. Y.; Gao, G.; Ha, F.; Cao, S. G. Resolution of N-(2-ethyl-6-methylphenyl) alanine via cross-linked aggregates of *Pseudomonas* sp. Lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v54, p.7-12, 2008.

APÊNDICE A

Curvas analíticas para determinação de atividades enzimáticas e proteínas

