

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

**IMOBILIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE EM QUITOSANA E APLICAÇÃO
VISANDO A MELHORA DO PERFIL AROMÁTICO DE VINHOS**

FRANCIELE ZALUSKI

Orientador: Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz
Coorientadora: Professora. Dr^a Tânia Haas Costa

Porto Alegre, maio de 2015.

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

**IMOBILIZAÇÃO DE β - GLICOSIDASE EM QUITOSANA E
APLICAÇÃO VISANDO A MELHORA DO PERFIL AROMÁTICO DE VINHOS**

Franciele Zaluski

(Química Industrial de Alimentos – UNIJUÍ/UERGS)

Dissertação apresentada ao curso de Pós Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Zaluski, Franciele

Imobilização de Beta-glicosidase em quitosana e aplicação visando a melhora do perfil aromático de vinhos / Franciele Zaluski. -- 2015.

67 f.

Orientador: Plinho Francisco Hertz.

Coorientador: Tania Haas Costa.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Imobilização de enzimas. 2. beta-glicosidase.
3. aroma. 4. quitosana. 5. vinho moscatel. I. Hertz,
Plinho Francisco, orient. II. Costa, Tania Haas,
coorient. III. Titulo.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Franciele Zaluski

Química Industrial de Alimentos – UNIJUÍ

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

(PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:

Homologado em:

Pela Banca Examinadora:

Por:

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz

Prof^a. Dr^a. Rosane Rech

Orientador – PPGCTA/UFRGS

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

Prof^a. Dr^a. Cláudia F. V. de Souza

Banca - UNIVATES

Prof. Dr. Vitor Manfroi

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

Prof.Dr. Juliano Garavaglia

Banca – UFCSPA

Prof. Dr. Vitor Manfroi

Banca - PPGCTA/UFRGS

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Plinho Francisco Hertz, pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela confiança e por todos os ensinamentos transmitidos durante todo esse período.

A professora Tânia Hass e professor Rafael Costa Rodrigues pelas contribuições ao trabalho e a minha formação.

A professora Cláudia Zini pela disponibilização de equipamentos, realização de treinamentos e sugestões que contribuíram muito ao trabalho.

Agradeço aos membros da banca, por terem aceitado o convite para discutir este trabalho, pelo tempo dispensado às correções e sugestões.

Aos colegas de laboratório pelo companheirismo e apoio constante.

A minha família e amigos pela paciência, apoio e presença constante em todos os momentos mesmo que distantes fisicamente.

Ao programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade.

Muito Obrigada.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. β -Glicosidase.....	11
2.2. Imobilização de enzimas	13
2.3. Tipos de imobilização	14
2.4. Suportes para imobilização	17
2.5. Quitosana	18
2.6. Vinho.....	20
2.7. Precursores de aromas	22
2.8. Hidrólise de glicosídeos	23
2.9. Determinação de Compostos Voláteis	26
3. RESULTADOS	28
3.1. Improvement of operational characteristics of β -glucosidase by immobilization on chitosan for use in increasing the aroma wine.....	29
4. TRABALHOS COMPLEMENTARES.....	54
5. CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS.....	59

IMOBILIZAÇÃO DE β - GLICOSIDASE EM CHITOSANA E APLICAÇÃO VISANDO A MELHORA DO PERFIL AROMÁTICO DE VINHOS

Autor: Franciele Zaluski

Orientador: Plinho Francisco Hertz

RESUMO

As β -glicosidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas. São amplamente encontradas na natureza em plantas, frutas e animais. Possuem diversas aplicações biotecnológicas podendo ser amplamente empregadas na indústria de alimentos e bebidas afim de melhorar a qualidade de aroma, sabor, coloração e viscosidade do produto. Este estudo apresenta o processo de imobilização de uma β -glicosidase comercial em suporte de quitosana e a obtenção de um derivado ativo e estável, para ser aplicado no processamento de vinhos aumentando a complexidade aromática de vinhos joven. A imobilização foi realizada em suporte de quitosana, reticulado com glutaraldeído, atingindo 100% de eficiência na imobilização com 50mg de proteína por grama de suporte e 65% de atividade recuperada no derivado imobilizado. A imobilização além de contribuir para um maior controle do processo, alterou algumas características da β -glicosidase, a qual demonstrou manter uma atividade mais alta em faixas mais amplas de pH, quando comparada a enzima livre. A β -glicosidase imobilizada apresentou grande estabilidade podendo ser reutilizada por mais de 30 ciclos, mantendo sua atividade inicial. A aplicação da β -glicosidase no vinho foi realizada em batelada, por um tempo de 90 min, sob agitação. A análise por SPME/GC-MS revelou um aumento na concentração terpenos, quando comparada a amostras não tratadas. Houve um aumento na concentração de geraniol, citronelol, linalol e nerol. A aplicação da β -glicosidase foi bem sucedida, liberando os compostos aromáticos em um curto período de tempo de contato. O processo de reutilização mostra que o biocatalisador imobilizado é uma ferramenta vantajosa para a indústria de bebidas.

Palavras-chave: β -glicosidase, imobilização de enzimas, quitosana, aroma, vinho.

IMMOBILIZATION OF β -GLUCOSIDASE IN CHITOSAN AND APPLICATION IN WINE FOR IMPROVIMENT THE AROMATIC PROFILE

Author: Franciele Zaluski

Advisor: Plinho Francisco Hertz

ABSTRACT

β -glucosidases are enzymes that catalyze the hydrolysis of glycosidic bonds. They are widely found in nature at plants, fruits and animals. They have various biotechnological applications being largely used in food and beverage industry for the enhance the product viscosity, coloration, flavour and aroma qualities. This study presents a commercial β -glucosidase immobilization in chitosan support in order to obtain an active and stable derivative, enabling its application in winemaking, enhancing the aromatic complexity in young wines. The immobilization process was conducted in chitosana support, cross-linked with glutaraldehyde, reaching 100% efficiency in immobilization with 50 mg of protein per gram of support and 65% recovered activity in imobilized derived. The immobilization of the enzyme contributes to greater control of the process, changed some features of β -glucosidase, which proved to be more stable at pH changes when compared to free enzyme. Also the immobilized β -glucosidase showed great operational stability been reused for more than 30 cycles maintaining its initial activity. The application of β -glucosidase in the wine was held in batch for 90 minutes under stirring. The analyzis by SPME / GC-MS revelead a increaseament in terpens concentration when compared to the sample without treatment. Was noticed a increase in geraniol, citronellol, linalool and nerol concentration. Apliccation of β -glucosidase was sucesfull, releasing aromatic compounds in contact for a short period of time. The reuses process showed that the immobilized biocatalyst is a advantageous tool for the beverage industry.

Keywords: β -glucosidase, Enzyme Immobilization, Chitosan, Wine, Aroma.

1 INTRODUÇÃO

As β -glicosidases (BGL) EC 3.2.1.21 são enzimas encontradas amplamente na natureza, podendo também serem produzidas por microorganismos como bactérias, fungos e leveduras (WATANABE, 1992). São biocatalisadores capazes de hidrolisar glicosídeos. Os glicosídeos são formados por uma molécula de glicona (monossacárido) unido a uma aglicona (composto não glicosídeo). Com a hidrólise enzimática ocorre a quebra da ligação glicosídica e a separação dos compostos (RIBÉREAU-GAYON, et al., 2006).

O processo de imobilização de enzimas vem sendo estudado devido o interesse em sua aplicação afim de acelerar processos, melhorar a qualidade dos produtos e, principalmente, devido as vantagens da utilização do biocatalisador imobilizado. Enzimas imobilizadas podem apresentar maior estabilidade, especificidade e seletividade, menor inibição por produtos da reação, além de serem facilmente separadas do meio de reação, havendo boa recuperação da atividade enzimática aumentando sua vida operacional e assim acarretando em economia e maior controle do processo (MENDES et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013).

A imobilização de glicosidases tem apresentado grande interesse devido seu potencial de aplicação na indústria de processamento de alimentos e bebidas afim de melhorar a qualidade de aroma, sabor e viscosidade dos produtos (DICOSIMO et al., 2013).

Na vinificação a formação do perfil aromático é um processo que envolve a variedade da uva, a fermentação e reações químicas e enzimáticas com liberação de grupos de compostos como terpenos, monoterpenos, derivados de benzeno, álcoois alifáticos e fenóis (MORENO-ARRIBAS, 2009). A maioria desses compostos estão presentes na forma glicoconjugados, não voláteis e inodoros. Glicoconjugados são glicosídeos, dissacáridos ou trissacáridos, sendo os glicosídeos de dissacáridos a principal fonte de compostos de aroma. A liberação hidrolítica do açúcar é necessária para liberar

a aglícana, que, então, torna-se volátil e conferir aroma ao vinho (MORENO-ARRIBAS, 2009).

O vinho Moscatel, proveniente da fermentação de uvas da variedade Moscato, é um vinho jovem que se destaca devido sua característica aromática com intenso aroma frutado e floral (NICOLLI, 2014).

A variação do clima do vinhedo exerce grande influência sobre a qualidade da uva e do vinho, por incidir nas respostas fisiológicas das plantas, o que vai se refletir diretamente na síntese de compostos importantes para o perfil aromático do vinho (CHAVARRIA, 2008). Assim, algumas enzimas podem ser aplicadas durante o processo de vinificação para auxiliar e corrigir alterações causadas por interperes.

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo imobilizar uma β -glicosidase comercial em esferas de quitosana e aplicar o derivado imobilizado em vinho. Para atingir este objetivo foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Realizar a imobilização da enzima de forma covalente em suporte de quitosana;
- Avaliar as condições de temperatura e pH para a atividade da enzima imobilizada;
- Estudo da inibição da β -glicosidase por glicose e frutose.
- Avaliar a estabilidade operacional da enzima imobilizada;
- Aplicar o biocatalisador imobilizado em vinho moscatell.
- Determinar os compostos aromáticos liberados com a palicação da enzima.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 β -glicosidase

β -glicosidase (BGL) EC 3.2.1.21 são enzimas encontradas amplamente na natureza em plantas, frutos, em animais e também podem ser produzidas por microorganismos, bactérias, fungos e leveduras. Os fungos são a principal fonte para obtenção da enzima comercial. Considerada um dímero, possui massa molecular de 240 Kda, Estável em pH 4,5-8,0 e sensível a temperaturas superiores a 55°C (WATANABE, 1992) .

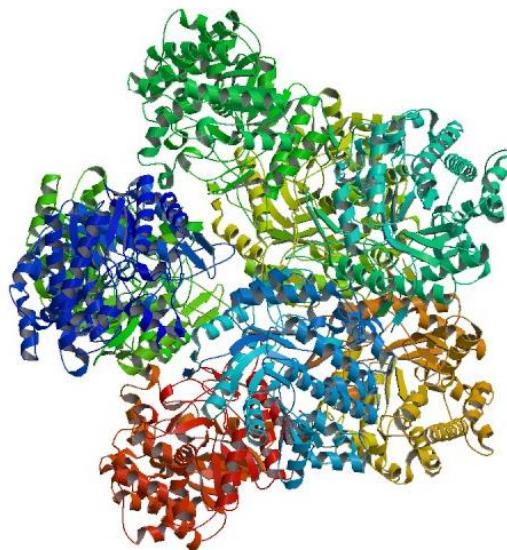


Figura 1: Estrutura de uma β -glicosidase de *Bacillus circulans* (HAKULINEN, et al., 2000).

A principal reação catalisada pela β -glicosidase é a hidrólise de ligações β -glicosídicas em glicosídeos menores como dissacarídeos, oligossacarídeos e glicosídeos conjugados (BHATIA, Y., 2002),

A velocidade de reação dessas enzimas pode ser estimulada devido a presença de alguns compostos sem que necessariamente estes sejam essenciais para sua atividade. Muitos íons e compostos foram descritos como estimulantes da atividade de β -glicosidase. Entre os íons destacam-se o cálcio para para BGL's de *Aspergillus niger*, *Clostridium stercorarium*, *Talaromyces thermophilus*; cobalto, para *Aspergillus japonicus*, *Zea mays*; ferro para *Aspergillus* sp.; magnésio para *Pectobacterium carotovorum*, *Daldinia eschscholtzii*; manganês para *Talaromyces thermophilus*. Dentre os compostos estimulantes podem ser citados alguns alcoóis como etanol, metanol, butanol e propanol (BRENDA, 2014).

A velocidade de reação também pode ser inibida, sendo a glicose o principal inibidor competitivo. Composto que apresenta semelhança estrutural com o substrato e compete com este pelo mesmo sítio ativo na enzima, assim quando o inibidor se liga o substrato não é mais capaz de se ligar (BRENDA, 2014).

β -glicosidases destacam-se por suas diversas aplicações biotecnológicas, atuando em diferentes compostos que possuem ligações glicosídicas. Podem ser empregadas na indústria, porém, existem ainda algumas limitações na sua ampla aplicação por causa de sua instabilidade da estrutura, separação da enzima do produto e a recuperação para aplicações repetidas (NISHA e GOBI, 2012; DICOSIMO, et al., 2013; SHELDON e VAN PELT, 2013).

Segundo a legislação brasileira, Resolução RDC 205 de novembro de 2006, que regulamenta a utilização de enzimas e preparações enzimáticas para uso em alimentos destinados ao consumo humano é permitida a utilização de β -glicosidases provenientes de *Aspergillus niger*, *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma reesei*.

2.2 Imobilização de enzimas

A imobilização pode ser definida segundo Cantareli (1989), como a fixação de enzimas ou células vivas em um ambiente, de maneira que sua atividade catalítica não seja afetada.

O termo “enzimas imobilizadas” pode ser definido como sendo enzimas confinadas e localizadas em um determinado espaço definido, com retenção de sua atividade catalítica e que pode ser utilizada repetidamente de forma contínua (KATCHALSKI-KATZIR, 1993).

Durante os anos 1950 e 1960, diferentes métodos de imobilização covalente foram desenvolvidos, continuando até hoje, havendo diversas publicações e técnicas de imobilização patenteadas (HOMAEI et al., 2013). O primeiro relato da utilização industrial de enzimas imobilizadas ocorreu em 1967 por Chibata e colaboradores, que desenvolveram colunas de Aminoacilase (*Aspergillus oryzae*) imobilizada, para síntese de aminoácidos (KATCHALSKI-KATZIR, 1993).

O procedimento de imobilização aparece como uma alternativa rentável para a utilização de enzimas em bioprocessos, uma vez que os biocatalisadores imobilizados ficam retidos em seu suporte separados do meio de reação podendo ser reutilizados (CAO, 2005; BRADY et al., 2009).

As enzimas imobilizadas apresentam-se altamente eficientes para aplicações industriais. Elas oferecem muitas vantagens comparadas as enzimas em solução, incluindo a conveniência econômica (HOMAEI et al., 2013). Na Tabela 1 é apresentado algumas aplicações industriais importantes utilizando enzimas imobilizadas.

<u>Enzima</u>	<u>EC</u>	<u>Substrato</u>	<u>Produto</u>
β -galactosidase	3.2.1.23	Lactose	Leite sem lactose
Lipase	3.1.1.3	Triglicerídeos	Substitutos da manteiga de cacau
Nitrílica hidratase	4.2.1.84	Acrilonitrila	Nicotinamida
Aminocilase	3.5.1.14	D, L-aminoácidos	L- Aminoácidos
Raffinase	3.2.1.22	Rafinose	Galactose e sacarose
Invertase	3.2.1.26	Sacarose	Mistura de glicose e frutose
Termolisina	3.4.24.27	Peptídeos	Aspartame
Glicoamilase	3.2.1.3	Amido	D-Glicose
Papaína	3.4.22.2	Proteínas	Remoção de "trube" em cervejas

Tabela 1: Principais aplicações industriais utilizando enzimas imobilizadas (Adaptado de HOMAEI et al., 2013).

Em geral, a imobilização oferece uma série de vantagens, incluindo a utilização da atividade catalítica por um maior período de tempo, possibilidade de operação contínua do processo, maior controle do processo, facilidade de separação do produto final, maior estabilidade ao pH e temperatura, facilidade de interrupção da reação (MENDES et al., 2011; KRAJEWSKA, 2004).

A escolha do método e do suporte de imobilização dependerá das características peculiares da enzima e das condições de uso do sistema imobilizado. Se a interação da enzima com o suporte não for estável suficiente pode ocorrer perda da mesma, caso a interação da enzima com o suporte seja maior que sua interação com o meio de reação, a eficiência do processo pode ser comprometida (SCHOFFER, 2012).

2.3 Tipos de imobilização

Os métodos utilizados para a imobilização de enzimas, podem ser divididos em físicos e químicos. O método físico apresenta interações fracas entre o suporte a enzima. Como métodos físicos podem ser citados a

adsorção, aprisionamento em gel, microencapsulação e formação de filmes enzimáticos. Métodos químicos apresentam ligações químicas covalentes, como: ligação covalente ao suporte, reticulação através da utilização de reagente e ligação cruzada com outras substâncias neutras (KRAJEWSKA, 2004; SCHOFFER, 2012; HOMAEI et al., 2013).

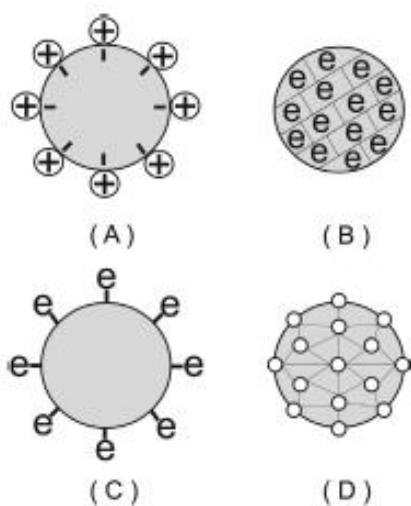


Figura. 3: Esquema ilustrativo de alguns métodos de imobilização de enzimas: A) adsorção; B) encapsulação; C) ligação covalente; D) ligação covalente cruzada (MARQUES et al., 2008).

No método de adsorção, a ligação da enzima no suporte é realizada através de interações hidrofílicas, iônicas e forças de Van der Waals, sendo considerado esse um método simples e barato, porém por se tratarem de ligações fracas, podem ser quebradas, ocasionando a perda da enzima (SHELDON e VAN PEELT, 2013).

A inclusão da enzima em uma estrutura interna ou encapsulamento, é realizada em suporte rígido e poroso, onde os poros devem ser de tamanho suficiente para garantir a difusão do substrato. Os métodos que empregam encapsulamento são baseados no confinamento da enzima em uma membrana

ou no interior de uma matriz a ser produzida de modo que a enzima permaneça inserida no interior do suporte ou envolvida por ele (HOMAEI et al., 2013; SHELDON e VAN PELT, 2013). O encapsulamento é um dos métodos mais simples, sendo a técnica de Sol-Gel a mais utilizada, porém pode haver problemas de difusão, principalmente quando os substratos usados são de elevada massa molecular (CARVALHO, CANILHA et al., 2006).

Ligações covalentes são mais fortes e estáveis, onde ocorre a ligação entre um grupo nucleofílico da enzima com uma hidroxila do suporte. As ligações covalentes podem ser multipontuais, ou seja, ocorrer com diferentes grupamentos amina, tornando assim a enzima presa ao suporte com maior força e rigidez. Ligações covalentes múltiplas reduzem a flexibilidade conformacional, vibrações térmicas e evita a desnaturação protéica (SHOFFER, 2012; SHELDON, 2007). Como desvantagem para utilização do método tem-se a possível modificação química da enzima, acarretando em perda de atividade (CAO, 2005).

A imobilização covalente em suportes que não possuem grupos funcionais disponíveis pode ser realizada utilizando reagentes de ligação como a genipina, carbodimida e o glutaraldeído, sendo este último o mais utilizado (CHIOU e WU, 2004; MATEO et al., 2007). O glutaraldeído fará a ligação covalente entre o suporte e o grupo amino terminal da enzima conforme Fig.4.

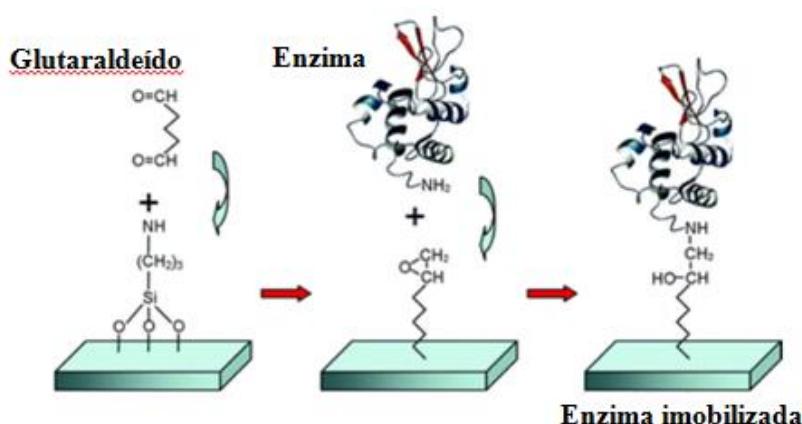


Figura 4: Ilustração da utilização do glutaraldeído como agente de ligação na imobilização enzimática.

Outro método de imobilização covalente utilizado é o “cross-linking”, este baseia-se em ligações cruzadas da enzima com outras substâncias neutras formando grupamentos, não sendo necessário a utilização de um suporte (SHELDON 2007; SHELDON e VAN PELT, 2013).

2.4 Suportes para imobilização

Diversas técnicas de imobilização de enzimas vem sendo testadas nas últimas décadas, bem como os suportes para utilização.

Os tipos de suportes podem ser classificados conforme sua natureza química, sendo divididos em orgânicos e inorgânicos. Como exemplos de suportes orgânicos tem-se polissacarídeos (celulose, agar, quitina), proteínas (colágeno, albumina), e alguns polímeros. Dentre os inorgânicos pode-se citar a bentonita, sílica, vidro e metais (BRENA et al., 2007).

Os suportes orgânicos são vantajosos por serem de menor custo, e de fácil degradação sem causar danos ambientais, porém são menos estáveis quando comparados aos suportes inorgânicos que possuem maior estabilidade térmica e resistência a solventes e contaminações.

Os suportes podem ser classificados como porosos e não porosos (Fig. 5).

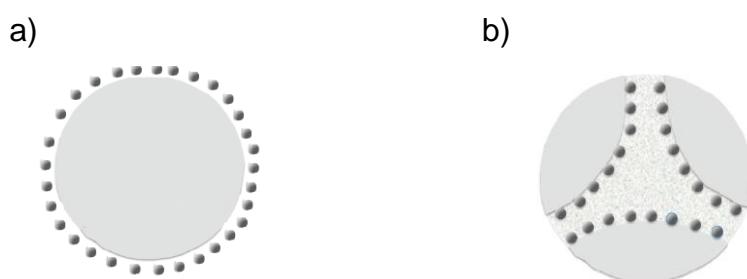


Figura.5: Imobilização enzimática em: a) Suporte não poroso e b) suporte poroso.

Suportes não porosos possuem uma menor área útil de contato para realizar a imobilização, porém as enzimas são imobilizadas na superfície do suporte não havendo problemas de difusão. Suportes porosos, pelo contrário, possuem maior área superficial, com maior capacidade de imobilização, mas ao utilizar a área interna do suporte podem haver problemas quanto a difusão. Ao utilizar suportes porosos deve-se considerar o tamanho dos poros em relação ao tamanho da molécula de enzima a ser imobilizada, para que não haja problemas quanto a eficiência da imobilização (GARDOSSI et al., 2009).

2.5 Quitosana

A quitosana é um poliaminossacarídeo, derivado da quitina, segundo polímero mais abundante na natureza, depois da celulose. Sendo proveniente da carcaça de crustáceos, resíduos da indústria pesqueira, é um produto de baixo custo, renovável e biodegradável e de grande importância econômica e ambiental (MENDES et al., 2011).

Caracteriza-se por sua insolubilidade em água, mas a presença de grupamentos amina lhe confere basicidade. Sua solubilização ocorre em soluções ácidas com pH abaixo de 6,5. Assim, a quitosana se dissolve facilmente em meio ácido para formar soluções viscosas que precipitam mediante um aumento do pH, formando complexos insolúveis em água, o que auxilia na produção dos géis de quitosana, em suas diversas formas, sejam esferas, membranas ou fibras (KRAJEWSKA, 2004).

No processo de geleificação ionotrópica, método que será utilizado nesse trabalho, a quitosana, diluída em solução ácida (catiônica), é gotejada em solução básica (polieletrolitos aniônicos), onde ocorre a imediata atração das moléculas, formando esferas de gel insolúveis (KRAJEWSKA, 2004).

A utilização de suporte orgânico de quitosana tem demonstrado bons resultados na imobilização de β -glicosidases. Martino et al., (1996), realizaram a imobilização de uma β -glicosidase comercial em suporte de quitosana e

obteve um rendimento de 55 a 85% em sua imobilização, mantendo um ótimo nível de atividade.

O processo de imobilização enzimática apresenta inúmeros benefícios, contudo para atingir um bom resultado é necessário considerar os diferentes métodos de imobilização e suportes disponíveis. O resultado de uma imobilização pode ser medida segundo Sheldon (2013), por sua eficiência e rendimento.

O fator de Rendimento da enzima imobilizada é expresso pelo percentual da atividade da enzima imobilizada em relação a enzima livre. A eficiência da imobilização descreve a atividade da enzima observada em relação à atividade imobilizada. Ao encontrar um bom rendimento na imobilização e uma baixa eficiência é sinal de que boa parte das enzimas imobilizadas foi inativada ou ficaram com o sítio ativo inacessível (SHELDON e VAN PELT, 2013).

2.6 Vinho

O vinho é definido pela legislação brasileira como uma bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uvas frescas e maduras. Também pode ser visto como o produto da transformação enzimática de mosto de uva.

O processo de produção do vinho Moscatel ocorre a partir da colheita, recepção das uvas, esmagamento e desengace para produção do mosto. Leveduras pré selecionadas são acrescentadas ao mosto, iniciando o processo de fermentação a temperatura ambiente em tanque aberto. Após ocorrerem as reações desejadas, o processo de fermentação é finalizado com o emprego de baixa temperatura, onde inicia-se a decantação e posterior filtração e envase, como pode ser observado na Fig. 6.

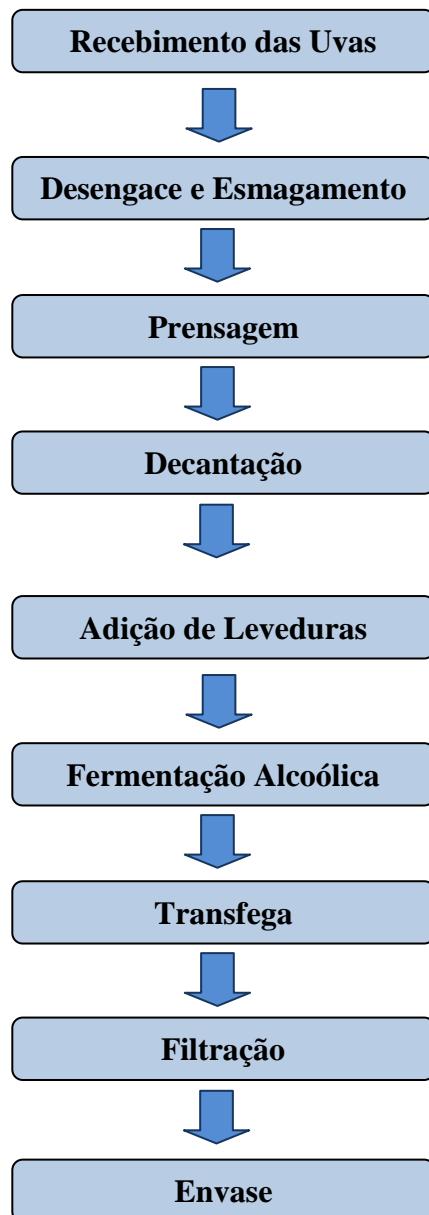


Figura 6: Etapas para produção do Vinho Moscatel (Modificado de SOARES, 2012).

A partir da fase de pré-fermentação, fermentação, pós-fermentação e envelhecimento, as enzimas são as principais forças motrizes catalisando diversas reações de biotransformação. Estes biocatalisadores se originam não só a partir da própria uva, mas também a partir de leveduras e outros

microrganismos (fungos e bactérias) associados com vinhas e adegas (RENSBURG e PRETORIUS, 2000).

A qualidade global de um vinho está no balanço de diferentes características sensoriais entretanto, o aroma desempenha maior relevância na sua distinção. Os compostos que o definem estão relacionados com a sua aceitação ou rejeição por parte dos consumidores.

O aroma pode ser definido como a sensação resultante dos compostos voláteis percebidos pelo tecido olfativo da cavidade nasal, atingindo os receptores quando aspirados pelo nariz (detecção nasal) e também através da garganta (detecção retronalatal). A intensidade da sensação olfativa depende da concentração das substâncias na fase líquida, de sua volatilidade e do seu limiar de percepção (NICOLLI, 2013).

Muitos compostos químicos como ésteres, álcoois alifáticos, terpenos, norisoprenóides, fenóis e ácidos graxos de diferentes concentrações contribuem com a liberação de aromas identificados no vinho, podendo estar presentes na forma livre, voláteis, ou inodoros, na forma glicosilada, não voláteis (GUNATA et al., 1982). Esses compostos podem ser classificados de acordo com as seguintes categorias, varietal, pré-fermentativo, fermentativo e pós-fermentativo neste inclui-se os aromas liberados durante a maturação ou envelhecimento (BAKKER e CLARKE, 2011).

- Varietal é característico da variedade específica da uva e das condições de cultura, clima, tipo de solo e grau de maturação. A uva moscatel, de característica aromática, contém precursores de aromas como ácidos graxos, glicosídeos e compostos fenólicos, com potencialidade para originar compostos aromáticos (RIBÉREAU-GAYON, 2006; MORENO-ARRIBAS et al., 2009).

- Pré-fermentativo apresenta-se no processo de colheita e maceração. Esse é caracterizado por álcoois e aldeídos formados a partir de ações enzimáticas que ocorrem naturalmente nos lipídeos e outras moléculas. Estes compostos apresentam aroma herbáceo e possuem baixo limiar de percepção (MORENO-ARRIBAS et al., 2009).

- Fermentativo é proveniente da ação das leveduras no processo de fermentação alcoólica. Os compostos voláteis produzidos nessa etapa do processo são os mais abundantes sendo assim responsáveis pelo aroma final do produto. Entre estes compostos estão os álcoois superiores, ácidos voláteis, ésteres e alguns aldeídos e cetonas (MORENO-ARRIBAS et al., 2009; BAKKER e CLARKE, 2011).
- Pós-fermentativo é proveniente de transformações que ocorrem devido a reações fisico-químicas de oxidação e redução de compostos presentes em vinhos jovens durante sua conservação e envelhecimento (DUTRA, R. 2012).
- Maturação: ocorre no processo de envelhecimento do vinho, onde ocorrem reações fisico-químicas, com posterior liberação de compostos aromáticos. Esta etapa contribui apenas para vinhos que não devem ser consumidos jovens (MORENO-ARRIBAS et al., 2009).

2.7 Precursors de aromas

Além dos compostos aromáticos presentes na uva, são encontrados outros compostos denominados precursores de aromas. Estes são compostos não voláteis, ligados a uma molécula de glicose e que, com ações enzimáticas são liberados. São eles: terpenos, norisoprenóides, fenóis e ácidos voláteis (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Os terpenos são os principais compostos precursores de aromas. São compostos que caracterizam aroma de flores, frutos, sementes, madeira e raízes. Sendo assim, de grande importância por agregar o aroma floral aos vinhos (VILANOVA et al., 2006).

A maioria dos compostos terpênicos do vinho são monoterpenos e sesquiterpenos, sendo os álcoois monoterpênicos como linalol, geraniol, nerol, citronelol, hotrienol os de maior importância, incluindo também os óxidos monoterpênicos, como o óxido nerol e óxido de rosa (SOARES, 2012). As

características sensoriais do vinho estão diretamente relacionadas a concentração dos diferentes monoterpenos. As características sensoriais de alguns monoterpenos mais importantes estão descritas na Tabela 2.

Composto	Aroma
Geraniol	Floral, cítrico, aroma de rosas.
Citronelol	Doce, cítrico, aroma de rosas.
Linalol	Floral, fresco, coentro.
Nerol	Floral, fresco, verde.

Tabela 2: Propriedades dos monoterpenos – aromas (Adaptado de Rensburg e Pretorius, 2000).

A quantidade total de compostos glicoconjugados em relação aos livres pode não ser muito diferente de algumas uvas de castas neutras. No entanto, em variedades aromáticas, como a Moscatel, podem ser de até dez vezes maiores (MORENO-ARRIBAS et al., 2009). Assim, segundo Bayonove (1988), a relação entre monoterpenos na forma conjugada e livre varia entre 1 e 5, em cultivares de uvas maduras de Riesling, podendo ser de até 15 em outras variedades. Desse modo, segundo o mesmo autor, estes precursores glicosilados constituem um importante potencial aromático em sucos e vinhos, uma vez que são muito pouco hidrolisados durante o processo de fermentação.

Muitas enzimas são endógenas da própria uva, de leveduras e outros microrganismos presentes no mosto. Porém, devido as condições de vinificação e presença de compostos inibidores, são pouco eficientes para catalisar algumas reações de biotransformação. Assim a adição de compostos enzimáticos comerciais, após o processo fermentativo, acaba sendo uma ferramenta a ser utilizada para liberação de compostos glicosilados, sem causar impactos negativos na estrutura do vinho (RENSBURG e PRETORIUS, 2000).

2.8 Hidrólise de glicosídeos

Pesquisas demonstram que em um grande número de frutas e vegetais os compostos de aroma são glicosilados formando glicoconjugados não voláteis e insípidos. A primeira evidência clara foi encontrada em 1969 por Francisco e Allcock em flores. O trabalho de Cordonnier e Bayonove em 1974, com base em estudos enzimáticos, sugeriu a ocorrência de compostos aromáticos (monoterpenos) glicoconjugados em uvas. Esse estudo foi mais tarde confirmado por Williams et al. em 1982.

Os compostos voláteis glicosilados identificados nas frutas e nas plantas são altamente complexos e diversificados, especialmente no que diz respeito ao radical aglicona. Observa-se algumas formas de compostos glicosilados presentes em uvas (Fig. 7).

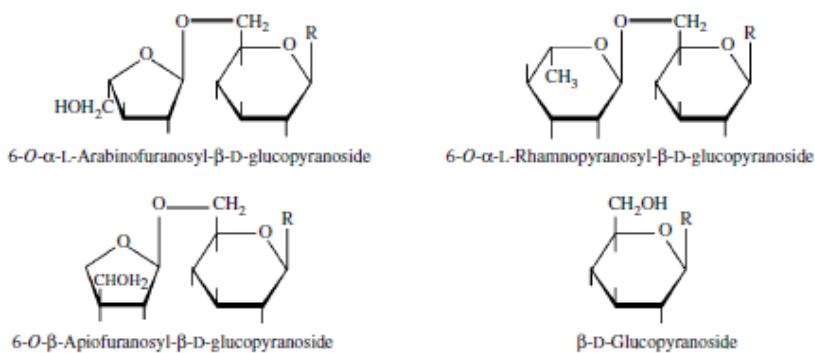


Figura 7: Formas de compostos glicosilados identificados em uvas: R: terpenos ou norisoprenóideis (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Uma característica comum dos precursores de aromas é o fato da porção aglicona estar sempre ligada α-D-glicopiranose. Compostos de aromas glicoconjugados estão presentes em várias frutas, tais como uva, pêssego,

ameixa, marmelo, cereja, maracujá, kiwi, mamão, abacaxi, manga e framboesa (WHITAKER, 2003).

Além dos compostos aromáticos, a maioria dos norisoprenóides que nas frutas são precursores responsáveis pelo sabor, foram detectados principalmente nas formas glicosídicas. Assim, compostos glicosilados tornam-se uma fonte importante de aroma e sabor (WHITAKER, 2003).

Os compostos voláteis glicosilados podem ser liberados por uma hidrólise ácida ou enzimática. A hidrólise ácida pode ser acelerada por meio de tratamento térmico. Porém, o aquecimento reduziria a qualidade sensorial do produto devido a outras alterações complexas (WHITAKER, 2003).

Os monoterpenos poli-hidroxilados (polióis) e a maioria dos norisoprenoides são inodoros, mas podem gerar compostos de aroma devido ao sua reatividade em meio ácido. Alguns derivados de hidroxilinalol, por exemplo, podem formar monoterpenos odoríferos, como hotrienol, óxido de nerol e óxidos de linalol (WHITAKER, 2003), conforme Fig. 8.

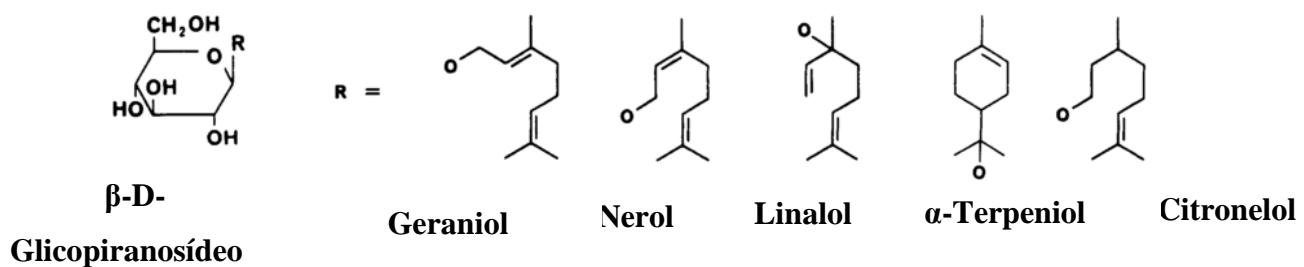


Figura 8: Estrutura dos principais monoterpenos glicosilados presente em uvas. (Adaptado de GUNATA et al., 1990).

2.9 Determinação dos compostos voláteis

Estudos empregando a técnica de microextração em fase sólida (SPME) para análise de compostos aromáticos em vinhos vem sendo realizados. Nesta técnica, uma fibra de sílica recoberta por uma fase extratora está presente no interior de uma agulha. Baseando-se na cinética de transferência de massa e no equilíbrio entre as fases, a SPME envolve dois processos, a adsorção de compostos voláteis da amostra no filme que recobre a fibra e a dessorção térmica dos compostos dentro do injetor do cromatógrafo, conforme Fig.9.

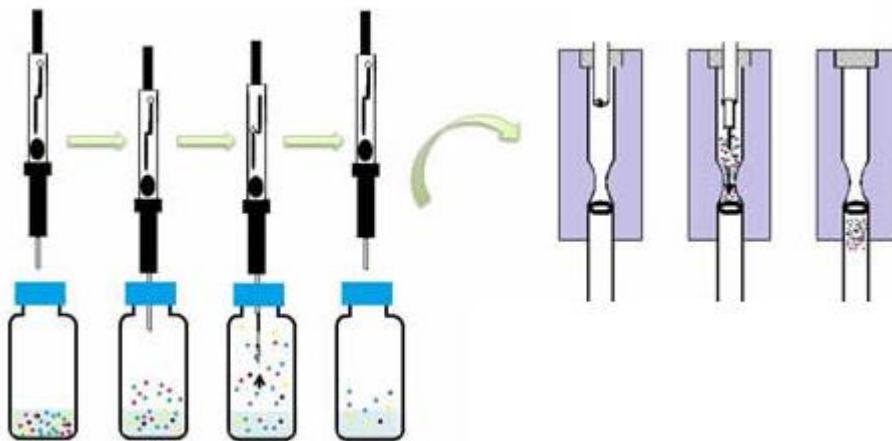


Figura 9: Ilustração da microextração em fase sólida e posterior dessorção (Adaptado de DAIJUN, 2012).

A adsorção é realizada ao expor a fibra ao "headspace" da amostra em uma determinada temperatura, não há emprego de solventes e é facilmente acoplada a cromatografia gasosa. Mendes et al.,(2011) demonstraram que a técnica de SPME pode ser utilizada para determinação qualitativa e quantitativa de compostos voláteis e semi-voláteis em vinhos. Sendo uma técnica promissora para extração de voláteis em bebidas alcoólicas muito utilizada para análise de vinhos nos últimos anos (DZIADAS et al., 2010).

A cromatografia gasosa permite a análise de compostos voláteis, os quais são transportados por uma fase móvel. A interação dos analitos com a fase estacionária ocasiona a separação dos compostos para posterior identificação e quantificação, utilizando um sistema de detecção. A cromatografia gasosa unida à espectrometria de massas tem sido empregada para análise de compostos voláteis em vinhos e espumantes, devido à resolução e sensibilidade fornecida pelo detector (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; ANTALICK et al., 2010; NICOLLI, 2013).

3 RESULTADOS

Os resultados referentes ao processo de imobilização da enzima e sua aplicação em amostras de vinho estão apresentados em forma de artigo, o qual será formatado segundo as normas da revista “Food Chemistry” para a qual será submetido para publicação.

3.1 Improvement of operational characteristics of β -glucosidase by immobilization on chitosan for use in increasing the aroma wine

Improvement of operational characteristics of β -glucosidase by immobilization on chitosan for use in increasing the aroma wine

Franciele Zaluski, Rafael da Costa Rofrigues, Tânia Haas, Cláudia Alcaraz Zini, Plinho Francisco Hertz

Abstract

This study report the immobilization of β -glucosidase in chitosan suport and aplication in Muscat wine in order to increase the volatile compounds. Young wines have a significant amount of flavor precursors in glycosylated form. The hydrolysis of these molecules was performed using β -glucosidase immobilized on spheres of chitosan in order to release terpenic and monoterpane compounds. The immobilization of the enzyme was successful and demonstrated that the β -glucosidase immobilized exceed its free form in many ways, a greater control of the process, biocatalyst recovery and is more stable under the proposed conditions: exhibited activity at pH ranges more wide, improved thermal stability and storage stability. The application of immobilized biocatalyst was made in Muscat wine, with a significant release of terpenic and monoterpane compounds as linalol, geraniol, citronellol and nerol, in a short period of time. Compared to the control sample, citronellol and geraniol had a greater increase, approximately 3 times more. It is considered relevant the increase of free terpenic compounds in the sensory aspect of the product, as well as promising the use of β -glucosidase immobilized on chitosana spheres in the wine industry.

1 Introduction

The consumer market preferences are of great influence on the style of wines produced, affecting the varieties of grapes planted and applied practices (Bruwer et al., 2011). Some wines are known to have more aromatic characteristics as Muscats and Riesling (Gunata et al., 1990). Aroma compounds in plants, flowers and fruit, particularly grapes are volatile molecules, however, there are a large amount of compounds non-volatile, as glycosylated molecules and tasteless, such as monoterpenes, sesquiterpenes and some higher alcohols (Spagna et al., 2000). The monoterpenes glycoconjugates (linalol, geraniol, citronellol, nerol and terpineol) are the main precursors directly linked to an aglycon and other sugars. They are important flavor compounds, particularly in grapes and wines, where represent a source of flavor with high potential (Sánchez Palomo et al., 2006; Cabaroglu et al. 2003). These compounds are non-volatile glycoconjugates (Williams et al. 1982) and need to be hydrolyzed, by acid or enzymatic hydrolysis, for the subsequent release of volatile part (Amino et al., 1990; Bayonove, 1988; Gueguen, Chemardin, Janbon, Arnaud, & Galzy, 1996)

β -glucosidase (EC 3.2.1.21) is the enzyme that catalyzes the hydrolysis of conjugated glycosides and disaccharides (Njokweni et al., 2012; Zhou et al., 2013). Found widely in nature, plants, fruits and animals, it can also be produced by different types of microorganisms (Watanabe 1992). There is an increasing interest of industries for the practical application of β -glucosidases in food processing and production of fruit juices and wines in order to improve its organoleptic characteristics (Shoseyov, Ami, Siege, Goldman, & Cohen, 1990; Martino, Pifferi, & Spagna, 1996; Palmeri e Spagna 2007). Actually, after conventional winemaking, a major part of the aroma potential of grapes remains unexpressed as non-volatile precursors (Loscos et al., 2010). In effect, the hydrolysis of glycosylated precursors of volatile compounds by enzymes from

grape, yeasts (alcoholic fermentation) and bacteria (malolactic fermentation) is often insufficient, for this reason, β -glucosidases rich enzyme preparations are often used to modify or enhance flavor of juices or wines (Rensburg & Pretorius 2000). Nevertheless, there are still some limitations in their wide application because of the instability of its structure, product separation and enzyme recovery for repeated applications (Nisha et al., 2012; DiCosimo et al., 2013; Sheldon & van Pelt 2013) . In effect, some typical winemaking conditions such as high ethanol concentrations and low pH may inhibit the enzyme activity (González-Pombo, Fariña, Carrau, Batista-Viera, & Brena, 2014). Besides, a failure in controlling the enzymatic reaction may be detrimental to the final wine. In red wines, the breaking of the glucosidic bonds can degrade anthocyanidins into colorless compounds which may results in off-color in red wines and the formation of undesirable flavors or an over-expression of aromas (Wang et al., 2013).

In order to overcome these drawbacks, the immobilization of β -glucosidase has been proposed allowing greater operational control, using the catalytic activity for longer time, ease in finishing the reaction, recover and reuse the enzyme (Sheldon 2007; Zhang et al., 2014; Mateo et al., 2007). In winemaking, immobilized β -glucosidases can be more easily and quickly separated from the wine providing a better control of the enzymatic reaction than the conventional method using precipitating agent (e.g., bentonite). Besides, the release of flavor precursors using immobilized enzymes can permit development of a continuous, automated process to increase the aroma of the wine (Caldini et al., 1994).

Moreover, immobilized enzymes can be more stable, and also have more activity, specificity and reduced tendency to be inhibited for the reaction products (Akkuş Çetinus & Nursevin Öztop, 2003; Mendes et al., 2011; Rodrigues, Ortiz, Berenguer-Murcia, Torres, & Fernández-Lafuente, 2013).

Some natural and synthetic materials have been explored as potential supports for immobilization of β -glucosidase, as alginate gel beads, polyacrylamide magnetite beads, chitosan, and new ionic liquid gel matrices (Vieira et al., 2011; R. & S. 2013). Between these materials, chitosan is

considered as an excellent support for the immobilization of enzymes (Akkuş Çetinus & Nursevin Öztop 2003; Krajewska 2004). Chitosan is produced from the deacetylation of chitin, which is a polymer abundant in nature. Its use is a form of recycling sub-products of the fishing industry (Mendes et al. 2011; Muzzarelli 1980). Besides it is inexpensive, inert, hydrophilic and biocompatible product, chitosan has antimicrobial properties and affinity with proteins (Krajewska 2004). It is porous and has a large area of adherence which reduces problems of steric hindrances. The structure of this polymer has reactive amino and hydroxyl groups, available for chemical modification reactions and covalent bonds that occur between the support and amino acids on the enzyme surface (Juang et al., 2002; Chiou & Wu 2004). Another characteristic that chitosan polymer is to create a microenvironnement that gives a extra protection for the immobilized enzymes concerning pH extremes. In effect, our previous studies shown that enzyme properties such as its optimum pH or the pH stability range may change when chitosan was used as support (Lorenzoni et al., 2014; Schöffer et al., 2013). In winemaking, it can also be useful to stabilize the enzyme and improve the activity in wine pH.

The objective of this study was to immobilize covalently a commercial β -glucosidase from *Aspergillus niger* on chitosan beads, and to evaluate the characteristics of the immobilized enzyme and application in order to improve the sensory characteristics of Muscat variety wine from Brazil.

2 Materials and methods

2.1 Materials

The β -glucosidase from *Aspergillus niger*, was provided by commercial preparation Lallzyme Beta (Scott Laboratories Inc, USA). Chitosan (from shrimp shells, $\geq 75\%$ deacetylated) and *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, were

purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Glutaraldehyde was from Nuclear. All other chemicals used were of analytical or HPLC grade. The Muscat wine, right after fermentation, was provided from Jolimont (RS, Brazil).

2.2 Methods

2.2.1 Protein quantification

Protein content (mg/mL) was assayed according to Lowry method (Lowry et al., 1951).

2.2.2 β -glucosidase activity

The β -glucosidase activity was determined using *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG) as substrate. The reaction mixture containing 75 μ L buffer 0,1 M sodium citrate, pH 4.8, 100 μ L of substrate solution (pNPG 0,013 mol/L) and 25 μ L of properly diluted free enzyme was incubated at 37 °C for 5 min. The reaction was stopped by addition of 1 mL of 5 M calcium phosphate solution at pH 10.

The activity of immobilized enzymes was measured by the same method, incubating 3 spheres with 300 μ L buffer 0,1 M sodium citrate and 300 μ L of substrate solution (pNPG 0,013 mol/L) at 37°C for 5 min. The reaction has stopped by removing an aliquot 200 μ L, of the contact the enzyme. This rate is added 1 ml of 5 M calcium phosphate solution.

The β -glucosidase activity was measured at 405 nm in spectrophotometer (model Ultrospec 3100 pro-UV/Visible, Amersham

Pharmaciabiotech), by reading the absorbance of p-nitrophenol released. A standard curve in the range between 0.3 and 1.7 mM was prepared using commercial p-nitrophenyl (Sigma, USA). One unit of β -glucosidase activity (U) was defined as the amount of enzyme required to hydrolyze 1 μ mol of p-nitrophenol per minute under the assay conditions.

2.2.3 Support preparation and activation

The chitosan support was prepared by precipitation using neutralization method (Zhou et al., 2013) the chitosan powder (2 % w/v) was solubilized in acetic acid solution (2 % v/v) and homogenized. This solution was added dropwise into a coagulation solution of 1 N sodium hydroxide and ethanol (26 % v/v). The beads formed were washed with distilled water until neutrality.

The activation of the chitosan particles was performed with a glutaraldehyde solution (5 % v/v) in phosphate buffer pH 7.0, at room temperature for 2 h under agitation. The excess of glutaraldehyde was removed by successive washes with distilled water.

2.2.4 Immobilization of β -glucosidase

Immobilization of β -glucosidase was performed incubating 100 chitosan spheres (0,05 g of support) with 10 mL of enzyme solution with different protein concentrations in order to test the support loading in citrate buffer (0.1M, pH 4.8). The mixture was incubated overnight, at room temperature under shaking in an orbital shaker (200 rpm). After this, the immobilized biocatalyst was washed sequentially with citrate buffer (0.1 M, pH 4.8), NaCl (1 M) and ethylene glycol (30 % v/v) in order to remove proteins adsorbed by ionic and hydrophobic bonds.

The yield of immobilized enzyme is expressed as percentage of the immobilized enzyme activity by the total of free enzyme. The efficiency of immobilization describes the enzyme activity observed in their immobilized activity. Immobilizations yield and efficiency were calculated as described by Sheldon and van Pelt (2013).

The immobilized activity was measured by difference of enzymatic charge offered and the residual enzyme activity found in the supernatant after the immobilization process. Therefore, the yield was obtained by relation of immobilization activity and enzymatic charge offered. Efficiency was done by relation between activity observed of enzyme in support and initial activity offered for immobilization. (Sheldon, 2013).

2.2.5 Effect of pH on β -glicosidase activity

The effect of pH on activity of free and immobilized enzymes was measured at different pH values, using citrate buffer from pH values of 3.5 to 6.0 with temperature fixed at 37 °C. The relative activity was calculated as the proportion of activity at each pH for maximum activity obtained.

2.2.6 Effect of temperature on β -glucosidase activity

Determination of temperature effect on the activity of free and immobilized enzyme was carried out by changing the reaction temperature (30 °C to 90 °C) fixing the pH at 4.8. The relative activity was calculated as the proportion between the activity at each temperature and the maximum obtained.

2.2.7 Determination of thermal stability

Thermal stabilities of free and immobilized enzyme were determined by incubating the diluted enzyme in buffer citrate pH 4.8 at 70 °C. Samples were taken periodically, and immersed in ice bath in order to stop the damage caused by high temperature and stored for later determination of enzyme activity. The residual enzymatic activity was expressed as percentage of enzyme activity observed at zero time. The half-life represents the time required for 50 % of the enzyme activity to decrease relative the initial activity and was calculated by the following equation:

$$\frac{A}{A_0} = \exp(-K \cdot t) \quad t_{1/2} = \ln(2)/K$$

Where A/A_0 is the relative activity (A is the enzyme activity at time t , and A_0 is the initial enzyme activity), K is the inactivation rate constant, and t is the incubation time of the enzyme solution. K was determined using a first order model for the data plotted the enzymatic activity A/A_0 versus time (min) using nonlinear regression.

2.2.8 Reuse and Operational stability in ethanol and glucose

The immobilized β -glucosidase stability to storage was conducted in the citrate buffer solution pH 3.5 with ethanol 12 % v/v and glucose 5 % w/v, simulating a model wine. The stability assay was measured for 30 times in 60 days of storage at 4°C.

Operational stability was evaluated by repeated batch reactions at 37°C for five minutes, as described in the determination of activity. Was carried repeat with new solution and substrate. Before each batch reaction, supports

with immobilized enzyme were washed with citrate buffer in order to remove residues of substrate or product. The activity measured in the first cycle was taken as 100 % for the calculation of remaining percent activity after reactions.

2.2.9 Inhibition of glucose

In order to determine the inhibition of enzyme activity in presence of glucose, the activity analysis were carried out in the presence of different concentrations of these inhibitors. Glucose was diluted in 0.1 M citrate buffer (0-200 mg/L in the reaction). The activity assay was performed as described.

2.2.10 Determination of glucose and fructose

The released glucose and fructose concentration was measuread by an enzymatic commercial kit, GOD-PAP, from In Vitro Diagnóstica Ltda (Brazil), According to the manufacturer's instructions. The samples were incubated at 37 °C and read in a spectrophotometer at 500 nm. The absorbances were compared to a standard concentration already known.

2.2.11 Enzymatic treatment of Muscat Wine

The immobilized β -glucosidase (5 U/mL of wine) was incubated in a Muscat wine harvest 2014, at 23 °C under agitation. The same experiment was conducted with a sample control, without the enzyme. After 90 minutes of incubation, aliquots were taken out to perform the quantification of glucose and characterization of aromatic compounds. The samples were compared with the

sample control. After use, the biocatalyst was washed with 0.1 M citrate buffer, pH 4.8 and the remaining activity was measured.

2.2.12 Volatile compounds extraction

The samples were prepared by solid-phase micro-extraction (SPME). The extraction of volatile compounds was carried out using 2 mL of sample and 30 % NaCl at 45 °C in a thermostatic block, SPME fiber was exposed in the headspace for 30 min(Soares et al., 2015). The volatile compounds were then adsorbed in the SPME fiber PDMS / DVB, considered the best coating for the extraction of the compounds of interest (Soares et al., 2015). Assays were performed in triplicate.

2.2.13 Identification of aroma compounds

After extraction, the SPME fiber was immediately injected into a gas chromatography with quadrupole mass spectrometer detector (GC-QMS) model Shimadzu QP2010, equipped with a nonpolar capillary column stationary phase (95 % methyl-polysiloxane, 5 % of phenyl groups, DB-5, 30m x 0.25mm x 0.25µm). The injection temperature was 250 °C with desorption time of 5 min and split injection method. The initial temperature was 45 °C and it has been heated up to 180 °C at a rate of 3 °C min⁻¹, reaching a final temperature of 240 °C at 20 °C min⁻¹. The flow of the carrier gas (helium analytical purity 99.999%, Praxair) was 1.0 mL/min. The MS parameters included electron ionisation at 70 eV and a mass range (m/z) of 45 to 450.

The compounds were tentative identified by comparing the Nist21, Nist107 and Wiley229 mass spectra libraries, considering a degree of similarity of 80 %. The identification was confirmed by comparing their mass spectra and retention indices with linear temperature programming (LTPRI) obtained

experimentally for the volatile compounds from wine by comparing them with those already reported in the literature. Retention data of LTPRI was obtained by using *n*-alkanes (C8–C18) in the experimental conditions employed for the chromatographic.

The peaks areas was calculated and compared between treated and non-treated samples to verify the increase of concentration of aromatic compounds.

3. Results and discussion

3.1. Immobilization of β -glucosidase

β -glucosidase was immobilized on chitosan-bead previously activated with glutaraldehyde by covalent bonding between the amino terminal group of the protein and glutaraldehyde. The effect of different loadings of protein per gram of support was studied in the range of 5 to 100 mg of protein. At higher protein load, there was a decrease in the efficiency and yield of immobilization. Therefore, the improved efficiency of support condicion of immobilization occurred at a load of 50 mg protein/g. This immobilized enzyme was used in other procedures reported. The results of 62 % efficiency and yield about 100 % was obtained in this work, were also found by other authors for covalent immobilization of glucosidase. Jie Chang et al., (2013) used of chitosan support in the immobilization the β -glucosidase and obtained yield about 60%. González-Pombo et al., (2011) was immobillized the β -glucosidase in commercial support Eupergit C, applied 4U/g support, obtained efficiency about 50% and yield of 60%. González-Pombo et al., (2014) immobilized the β -glucosidase from a commercial *Aspergillus niger* preparation in acrylic support Eupergit C and obtained efficiency of 83% and yield of 68%.

In case of find a good yield in immobilization and a relatively lower efficiency is a sign that part of the immobilized enzyme was inactivated or were inaccessible to the active site (Sheldon, 2013).

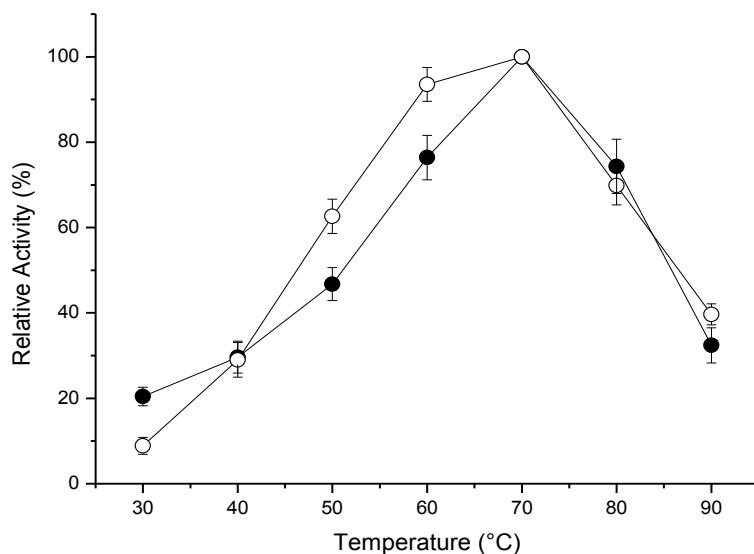
3.2. Optimum Temperature and pH

The properties of the enzyme activity may suffer alterations due to the changes provided by the support after immobilization. Before, the enzymatic properties of the immobilized β -glucosidase were compared with those free enzyme. The immobilization process can maintain or even increase the optimum temperature of the β -glucosidase (Su et al., 2010; Nawani & Kaur 2007). The optimum temperature for free and immobilized enzyme was analyzed in range of 30-90 °C, and are presented in Figure 1A. The results demonstrated that both, immobilized and free enzyme, behaved similarly in the different temperature ranges, and 70 °C was the temperature of maximum activity for both. A similar results to optimum temperature of β -glucosidase, whitout major changes, was found by Martino et al., (1996) in covalent immobilization to chitosan cited by Pu Zheng et al., (2013) that related results from different authors of immobilization β -glucosidase from commercial preparation, all obtained range of great temperature about 70 °C.

Changes in activity related to pH for free and immobilized enzyme was analyzed within the range of 3.5 - 6.0. The results show that free and immobilized enzyme behaved similarly, the optimum pH being 4.8 for both. However, the activity of immobilized β -glucosidase was higher than that of free β -glucosidase at pH<4.0 or pH>5 (Fig. 1.), suggesting that immobilization has conferred some protection to enzyme when the reaction occurred in a range of pH acid or neutral. Similar results was obtained by Martino et al., (1996) and Jie Chang et al., (2013) in chitosan support immobilization and also by Erzheng Su et al., (2010) in alginate support. For all, the activity of the immobilized β -glucosidase was greater compared to free enzyme over a wider pH range. In either case, our results certainly confirmed theirs and is of great interest since

the immobilized enzyme will be intended for use in the pH values typical wine acid. The possible explained is due the support made with chitosan contributed to the best activity at acid pH, because its electrostatic nature, causing a protection for the enzyme. Other authors have been reported more stability of the enzyme at alkaline pH (J. Zhang et al., 2014; Barbagallo et al., 2004). These range of optimum pH and temperature have been reported for glucosidases fungal origin of *Aspergillus spp.* (C. Zhang et al., 2007; Barbagallo et al., 2004; Spagna et al., 2002;).

a)



b)

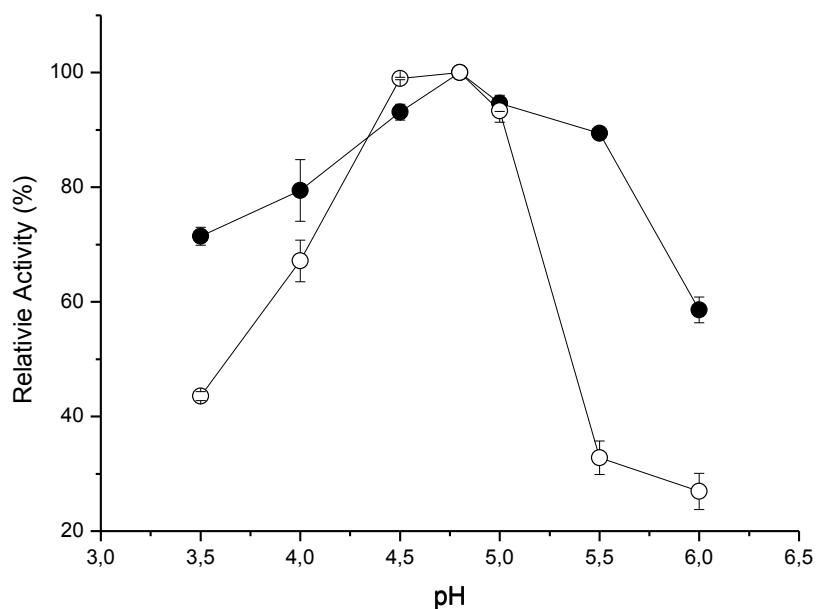


Fig. 1. Effect of the temperature (a) and pH (b) on the activity of free (○) and immobilized (●) β -glucosidase. (a) Activities were assayed at different temperatures using sodium citrate buffer (0.1 M, pH 4.8). (b) Activities were assayed at 37 °C and different pH values.

3.3. Thermal stability

Determination of thermal inactivation is important as a limiting factor for prolonged use of the enzyme in industrial process. Considering the temperature of maximum activity of the β -glucosidase 70 °C, this temperature was used for the assay of thermal stability.

Table 1. Parameters of Thermal Inactivation of Free and Immobilized β -Glucosidase at 70°C

Biocatalyst	K (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	r^2
Free β -Glucosidase	0,123	5,6	0,85
Immobilized β -Glucosidase	0,0084	82,5	0,98

The free enzyme declined its activity during the first 5 min (half-life) being completely deactivated up to 15 min, while the immobilized enzyme maintained above 50 % of its activity during 83 min of exposure to heat, and was then inactivated after 420 min (Tab. 1). The considerable increase in thermal stability of the immobilized enzyme could be due to that the immobilization and cross-linking process make the external structure β -glucosidase molecule more rigid (Rodrigues et al., 2013). Besides, the charged character of chitosan may improve the stability of enzyme molecule. Despite in winemaking the process is generally conducted at low temperatures, the stability of the immobilized enzyme at high temperatures suggests his higher stability in general.

3.4. Operational Stability

The stability of immobilized enzymes is an important economic parameter for their application in industrial process. In order to simulate the application conditions of glucosidase in wines and also his stability at storage, the immobilized enzyme was maintained in a solution containing ethanol and glucose at pH 3,5 and its activity was measured after 60 days of storage at 4 °C. The immobilized enzyme was also used to verify the operational stability in consecutives batch reactions, maintaining 100 % of its initial activity after 30 reuses (Fig.2). The immobilized enzyme stability demonstrated an economically viability in industrial process.

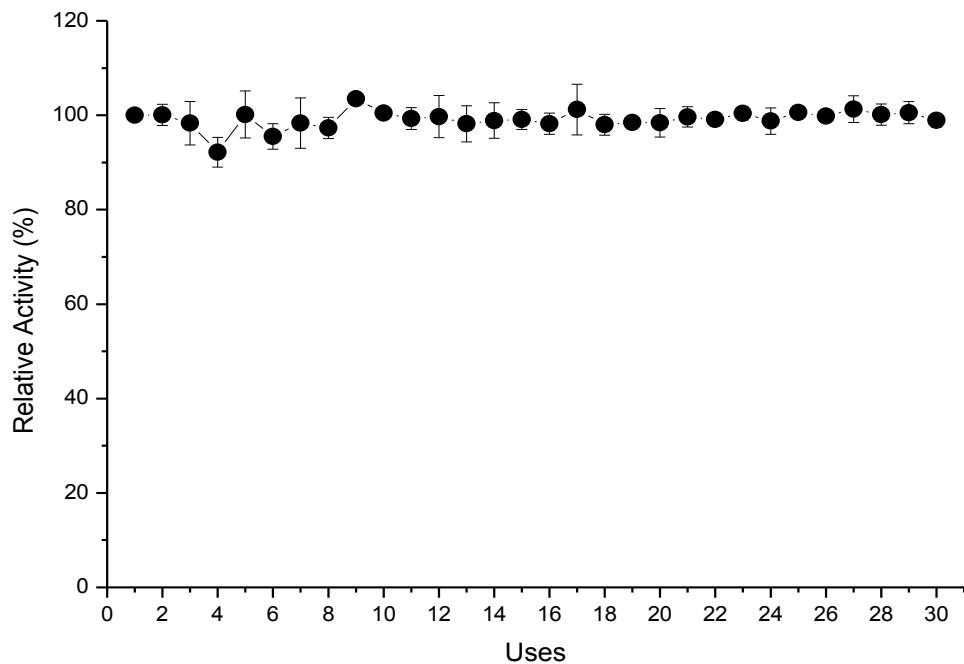


Fig. 2. Operational stability of the β -glucosidase immobilized. Activities were assayed at 37 °C and pH 4,8 (sodium citrate buffer 0.1 M) with substrate in consecutive batch reactions of 5 min for 30 uses. Experiment were carried out in duplicate.

3.5. Inhibition of β -glucosidase by glucose and fructose

Glucosidase inhibition by glucose and fructose is an important factor to be considered due to the presence of these natural sugars in the grape. Studies showed that these sugars can act as inhibitors of the catalytic activity of β -glucosidase, and glucose has been reported as a competitive inhibitor. (Belancic et al., 2003; SARRY & GUNATA 2004; Lecas et al., 1991; Wang et al., 2012; Caldini et al., 1994). In competitive inhibition the inhibitor has structural similarity to the substrate and competes with it for the same active site of the enzyme. Relative catalytic activity of 50 % was obtained at a

concentration of 20 g/L of glucose and fructose and complete inhibition was achieved with 200 g/L of sugar (Fig. 3).

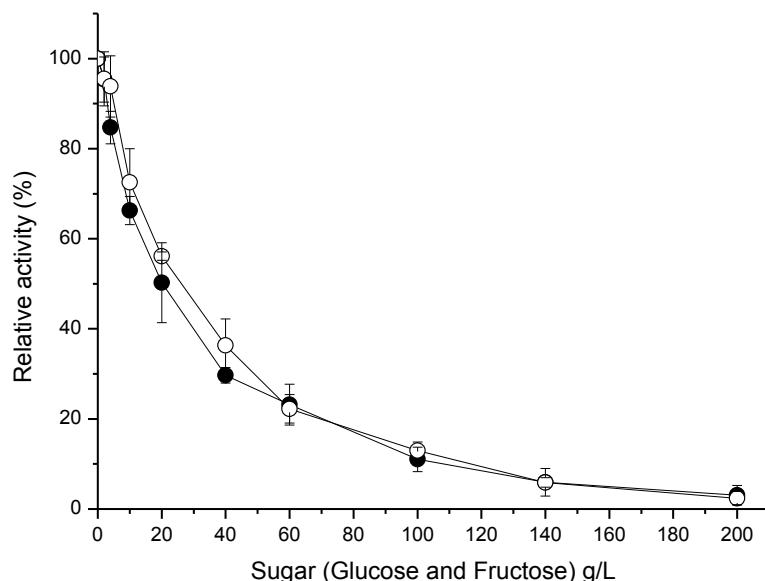


Fig. 3. Inhibition of free and immobilized β -glucosidase by glucose and fructose 50%/50%. Activities were assayed at 37 °C and pH 4.8 (sodium citrate buffer 0.1 M) with sugars (blend of glucose and fructose) at different concentrations.

The free and immobilized β -glucosidase apresentated similar results in the analisys of the inhibition by glucose and fructose, what suggest that the immobilization process did not change or make it dificult the access to the active site of the enzyme.

Thus, the application of β -glucosidases in order to release flavor compounds becomes inadequate in fruit juices but viable after the fermentation step, when the sugar content is already reduced.

3.6. Release of aromatic compounds

Aiming to evaluate the release of glucose and aromatic compounds, the immobilized β -glucosidase was incubated in wine and after the incubation period, the quantification/determination of the compounds was performed by SPME GC-MS. The peaks areas were calculated and compared before and after application of the biocatalyst (Fig.4).

After treatment with the immobilized enzyme, it was observed an increase in the content of aromatics and terpenes monoterpenes in the wine. The increase was more remarkable at linalol, nerol, citronellol and geraniol, which indicates the presence of a large glycosylated flavor precursors of this type that can be explored. Similar data were found by Pombo et. al (2014) that used the immobilized enzyme in Eupergit C commercial support and obtained significant release of these compounds.

The application of the free enzyme was performed as a control under the same conditions, and not noticed a difference in the aromatic compounds hydrolysis between the application of the free and immobilized enzyme.

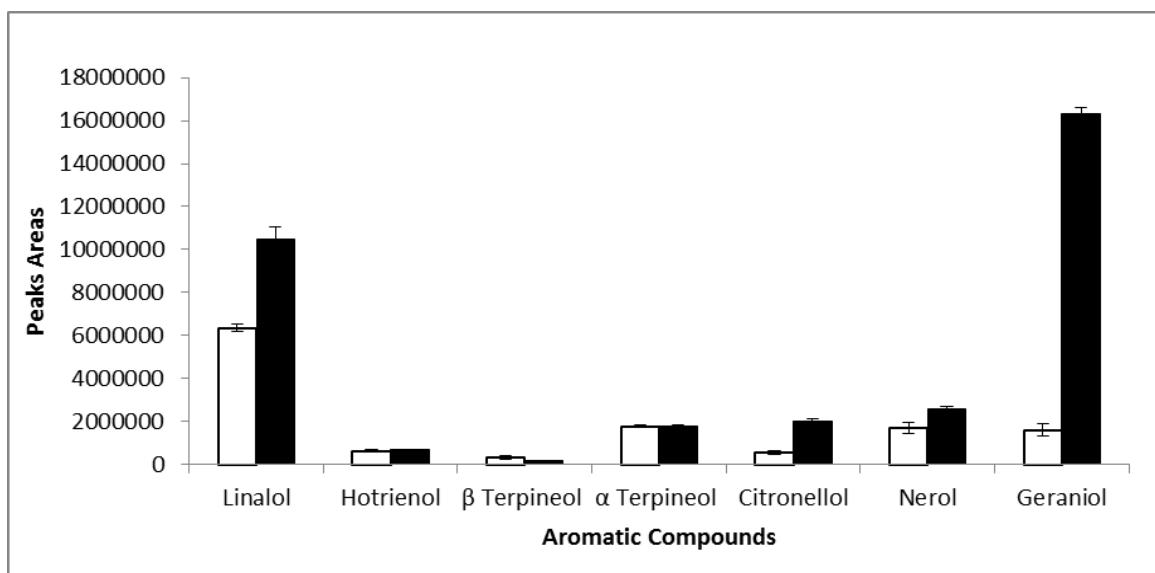


Fig. 4. Aromatic compounds present in the Muscat wine solution before (□) and after (■) treatment with β -glucosidases immobilized in chitosan beads, for 90 min at 23°C.

After the use of β -glucosidase a large amount of glucosides were hydrolyzed releasing aroma. The terpene compounds increased significantly, especially geraniol, linalol and citronellol. Geraniol is one of the monoterpenes responsible for adding the floral aroma of young wines (VILANOVA et al., 2006). The compounds: geraniol, citronellol, linalool and nerol are the most interesting compounds of the olfactory viewpoint (Soares, 2012; Bakker J., Clarke, R. J., 2004).

4 Conclusions

The immobilization of a commercial β -glucosidase in support of chitosan maintained the function of the biocatalyst, hydrolyzing conjugated aromatic compounds present efficiently. Immobilized biocatalysts have several advantages over the soluble enzyme preparations, especially greater control of the hydrolysis process that can prevent the generation of undesirable compounds.

This report was successful in covalent immobilization of β -glucosidase in a simple and low cost chitosana support. The immobilization process promoted a greater thermal stability and pH ranges compared to its free form. The immobilized β -glucosidase can be useful in order to release the aromatic compounds of different beverages, hydrolyzing glycosylated precursors and releasing the desired aromas in a shorter period of time contact and with more control in the process, also the stability during the process the reuses shows that the immobilized biocatalyst is an advantageously tool to the beverage industry.

Acknowledgments

The authors thank the UFRGS, the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) that supported this work.

References

- Akkus et al. Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 7, p.889–894, 2003.
- Barbagallo, R.N. et al. Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 1, p.58–66, 2004.
- Belancic, A. et al. β -glucosidase from the grape native yeast Debaryomyces vanrijiae: purification, characterization, and its effect on monoterpane content of a Muscat grape juice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 5, p.1453–9, 2003.
- Bruwer, J.; Saliba, A.; Miller, B. Consumer behaviour and sensory preference differences: implications for wine product marketing. **Journal of Consumer Marketing**, v. 28, n. 1, p.5–18, 2011.
- Cabaroglu, T. et al., 2003. Wine flavor enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, n.5, p.581–587.

Caldini, C. et al. Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidases for aroma enhancement in wine. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, n.5, p. 286–291, 1994.

Chang, M.Y.; Juang, R.S. Use of chitosan-clay composite as immobilization support for improved activity and stability of β -glucosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n.1, p.93–98, 2007.

Chiou, S.H.; Wu, W.T. 2004. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**, v. 25, n.2, p.197–204, 2004.

DiCosimo, R. et al., 2013. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society reviews**, v.42, n.15, p.6437–74, 2013.

González-Pombo, P. et al. Aroma enhancement in wines using co-immobilized *aspergillus Niger* glycosidases. **Food Chemistry**, v. 143, n.1, p.185–191, 2014.

González-Pombo, P. et al., 2011. A novel extracellular β -glucosidase from *issatchenkaia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white muscat wine. **Proces Biochemistry**, v.46, n.1, p. 385-389, 2001.

Gunata, Y.Z. et al. Hydrolysis of grape monoterpenyl β -D-glucosides by various β -glucosidases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,v.38, n. 5, p.1232–1236, 1990.

Homaei, A.A. et al. Enzyme immobilization: an update. **Journal of chemical biology**, v. 6, n. 4, p.185–205, 2004.

Juang, R.S.; Wu, F.C.; Tseng, R.L. Use of chemically modified chitosan beads for sorption and enzyme immobilization. **Advances in Environmental Research**, v. 6, n. 2, p.171–177, 2002.

Krajewska, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p.126–139, 2004.

Lecas, M.; Gunata, Z.Y.; Bayonove, C.L. Purification and partial characterization of β -glucosidase from grape. **Phytochemistry**, v. 30, n.1, p. 451–454, 1991.

Lorenzoni, A.S.G. et al.. Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized β -fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. **Carbohydrate polymers**, v. 103, p.193–7, 2014.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p. 265-275,1951.

Martino, A.; Pifferi, R.G.; Spagna, G. Immobilization of β -Glucosidase from a Commercial Preparation . Part 2 . Optimization of the Immobilization Process on Chitosan. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 3, p.287–293, 1996.

Mateo, C. et al. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization. **Biochemical Society transactions**, v. 35, n. 6, p.1593–1601, 2007.

Moreno-Arribas, M.V.; Polo, M.C. **Wine Chemistry and Biochemistry**, 2009.

Muzzarelli, R.A.A. Immobilization of enzymes on chitin and chitosan. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 2, n. 3, p.177–184, 1980.

Nawani, N.; Kaur, J. Studies on lipolytic isoenzymes from a thermophilic *Bacillus* sp.: Production, purification and biochemical characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n.4, p.881–887, 2007.

Nisha, S., S, A.K. & Gobi, N. A Review on Methods , Application and Properties of Immobilized Enzyme. **Chemical Science Review and Letters**, v.1, n. 3, p.148–155, 2012.

Njokweni, P.; Rose, S.H.; Van Zyl, W.H. Fungal β -glucosidase expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 39, n. 10, p.1445–52, 2012.

Reshma, R.; Sugunam, S. Improved biochemical characteristics of crosslinked β -glucosidase on nanoporous silica foams. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, p.111–118, 2013.

Rensburg, P; Van Pretorius, I.S. Enzymes in Winemaking : Harnessing Natural Catalysts for Efficient Biotransformations - A Review. **S. Afr. J. Enol. Vitie**, v. 21, 2000.

Rodrigues, R.C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p.6290–307, 2013.

Sánchez Palomo, E. et al. Contribution of free and glycosidically-bound volatile compounds to the aroma of muscat “a petit grains” wines and effect of skin contact. **Food Chemistry**, v. 95, n.2, p.279–289, 2006.

Sarry, J.; Gunata, Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors. **Food Chemistry**, v. 87, n. 4, p.509–521, 2004.

Schöffer, J.D.N. et al. Continuous production of β -cyclodextrin from starch by highly stable cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on chitosan. **Carbohydrate polymers**, v. 98, n. 2, p.1311–6, 2013.

Sheldon, R.A.; Van Pelt, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 15, p.6223–35, 2013.

Sheldon, R.A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8-9, p.1289–1307, 2007.

Shoseyov, O. et al. Immobilized Endo- & glucosidase Enriches Flavor of Wine and Passion Fruit Juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 12, pp. 1387–1390, 1990.

Soares, R.D. et al., 2015. Monitoring the evolution of volatile compounds using gas chromatography during the stages of production of Moscatel sparkling wine. **Food chemistry**, v. 183, p.291–304.

Spagna, G. et al. A mixture of purified glycosidases from *Aspergillus niger* for oenological application immobilised by inclusion in chitosan gels. **Enzyme and microbial technology**, v. 30, pp.80–89, 2002.

Spagna, G. et al. 2000. A simple method for purifying glycosidases: alpha-l-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of Moscato wine. **Enzyme and microbial technology**, v. 27, n. 7, p.522–530, 2000.

Su, E. et al., 2010. Immobilization of β-glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, n. 2-3, p.83–89, 2010.

Vieira, M.F. et al. β-Glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reactive groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, n. 1-2, p.47–53, 2011.

Wang, Y. et al. Different influences of β-glucosidases on volatile compounds and anthocyanins of Cabernet Gernischt and possible reason. **Food Chemistry**, v. 140, n. 1-2, p.245–254, 2013.

Wang, Y.; Xu, Y.; Li, J. A novel extracellular β -glucosidase from Trichosporon asahii: yield prediction, evaluation and application for aroma enhancement of Cabernet Sauvignon. **Journal of food science**, v. 77, n. 8, p.505–15, 2012.

Watanabe, T. et al. Purification and properties of Aspergillus niger β -glucosidase. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, n. 2, p. 651-659, 1992.

Williams, P.J. et al. Studies on the hydrolysis of Vitis vinifera monoterpenes precursor compounds and model monoterpenes β -D-glucosides rationalizing the monoterpenes composition of grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, p. 1219-1223, 1982.

Zhang, C. et al. Purification and characterization of piceid- β -D-glucosidase from Aspergillus oryzae. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 1, p.83–88, 2007.

Zhang, J. et al. Efficient resveratrol production by immobilized β -glucosidase on cross-linked chitosan microsphere modified by L-lysine. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 104, p.29–34, 2014.

Zhou, Y. et al. Optimal immobilization of β -glucosidase into chitosan beads using response surface methodology. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 6, , 2013.

4. TRABALHOS COMPLEMENTARES

Além dos resultados apresentados no apêndice 2.1, foram realizados durante o período de mestrado, testes para verificação de melhor método a realizar atividade enzimática e aplicações em outras amostras de vinho e suco de uva.

A aplicação do biocatalisador imobilizado foi realizado em Vinho Moscato, conhecido largamente pela sua característica aromática e vinho Malvasia, também conhecido por sua característica doce e aromática.

O experimento utilizando o Vinho Malvasia, originário da Serra gaúcha, foi realizado conforme descrito para o vinho moscato. Após a fermentação do vinho, foi coletado uma amostra na qual foi adicionado o biocatalisador imobilizado. A aplicação ocorreu em batelada, em sistema fechado com agitação por 90 minutos a temperatura de 25°C. Ao término da reação, realizou-se a extração dos compostos voláteis via SPME e posterior injeção em GC-MS. Para identificação dos compostos cromatográficos os dados foram comparados com resultados já apresentados na literatura através do cálculo do índice de retenção com programação linear de temperatura (LTPIR, do inglês *linear temperature programmed retetion indices*). As áreas dos picos foram calculadas comparadas entre amostras tratadas e amostra padrão, sem tratamento, apresentando o resultado demonstrado abaixo.

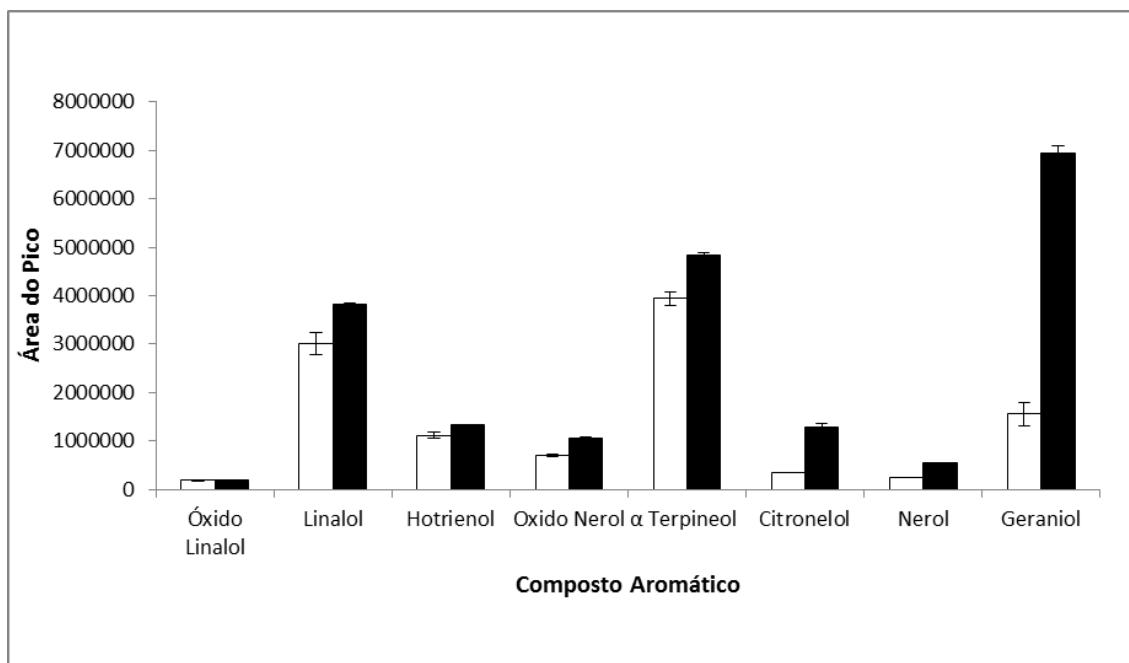


Fig. 10. Compostos aromáticos presentes no vinho antes(◻) e depois (■) do tratamento com β -glicosidases imobilizada em esferas de quitosana.

Foram identificados mais de 40 compostos na amostra. No entanto, optou-se por trabalhar apenas com alguns dos compostos de interesse, com características aromáticas. Os dados foram tratados conforme descrito no item 2.2.

O vinho Malvasia após tratamento com a β -glicosidase apresentou maior concentração de compostos aromáticos, com destaque para Geraniol, Citronelol, Nerol e Linalol. O Geraniol apresentou aumento de aproximadamente 5 vezes comparado a amostra sem tratamento. Obteve-se resultados muito próximos aos encontrados no vinho Moscato em relação aos compostos monoterpenicos liberados. As amostras de Malvasia apresentaram alguns compostos aromáticos como o óxido de linalol, que não foi percebido no Moscato, este composto é característico da própria uva, responsável pelo aroma floral do vinho. Os compostos liberados são os de maior importância do ponto de vista sensorial neste tipo de vinho (PERESTRELO et al., 2014).

Realizou-se também teste de aplicação em vinho Sirah, conhecido como robusto e pouco aromático, este foi adquirido já maduro. O procedimento de incubação foi realizado conforme já descrito, utilizando tempo de reação de 90 e 120 minutos. O procedimento de extração (SPME) e injeção foi realizado nas mesmas condições dos demais vinhos, porém a amostra tratada e não tratada não apresentou diferença. Também não tivemos separação e identificação significativa dos compostos de interesse, possivelmente pelo fato das uvas Sirah possuírem essa característica menos aromática e o vinho estar maduro, onde todo seu potencial aromático já estaria liberado. Desse modo, optou-se por trabalhar com vinhos jovens os quais apresentam maior concentração de compostos ainda glicosilados.

Assim, percebe-se que a aplicação da enzima imobilizada é eficiente em vinhos jovens com característica aromática, que possuem alto teor de compostos aromáticos glicosilados, provenientes da própria uva.

A aplicação do biocatalisador em amostras de suco de uva tinto integral não foi viável devido ao alto teor de glicose apresentado. Sabendo que a glicose é um inibidor competitivo, inicialmente foi analisado o teor de açúcares presente na amostra. Uma alíquota da amostra diluída 1:10 mL filtrada em membrana 0,22 µm foi injetada em sistema HPLC (Shymatzu), acoplado a um detector de índice de refração, utilizando a coluna Aminex HPX-87C (300mm X 7.8mm). Foram utilizados padrões de frutose, glicose e sacarose, com pureza superior a 99%. Como fase móvel, foi utilizada água ultrapura, com fluxo isocrático de 0,6 mL·min⁻¹ e temperatura do forno de 85°C. Foram injetados 10 µL de solução dos padrões e amostras. Os resultados obtidos foram: teor de glicose de 72 g/L e frutose 68 g/L. Considerando a curva de inibição descrita anteriormente, no artigo acima (pág 34), considera-se a aplicação em sucos com alto teor de glicose um ponto a ser estudado utilizando enzimas menos sensíveis a inibição competitiva. Pode-se ainda propor modificações na própria enzima, com a inserção de alterações no sítio ativo ou ainda, uma forma mais simples, oferecendo cargas maiores de enzima para compensar a inibição.

5. CONCLUSÕES

O principal objetivo deste trabalho, realizar a imobilização covalente de β -glicosidase em esferas de quitosana e aplicar na modificação do perfil aromático de vinhos, foi alcançado. Isto foi realizado de forma simples e com baixo custo, utilizando a quitosana como suporte. O processo de imobilização promoveu maior estabilidade térmica e maior faixa de atividade de pH, quando compara-se a enzima imobilizada com a sua forma livre. Este último aspecto, de grande relevância, quando considera-se que o pH do vinho é inferior ao pH ótimo para a atividade da enzima livre. Assim, a β -glicosidase imobilizada pode ser utilizada para liberar compostos aromáticos do vinho, hidrolisando os precursores de aromas glicosilados em um curto período de tempo de contato, agregando um maior controle do processo, uma vez que a separação do derivado enzimático é bastante fácil, permitindo parar a reação de forma imediata quando for desejado. Além disso, a determinação da estabilidade operacional, durante as reutilizações, mostra que o biocatalisador imobilizado é uma ferramenta vantajosa para a indústria das bebidas, uma vez que mesmo após trinta utilizações a atividade do derivado permaneceu inalterada, demonstrando assim viabilidade de múltiplas utilizações do mesmo derivado.

A fim de continuar e aperfeiçoar este trabalho, as perspectivas são citadas abaixo:

- Continuar estudando o processo de imobilização da β -glicosidase em esferas de quitosana;
- Utilização também da técnica de Cromatografia acoplada a olfatometria para análise dos compostos liberados;
- Avaliar a viabilidade da utilização do suporte contendo o biocatalisador em reator de grande escala para aplicação industrial, bem como sua viabilidade econômica;
- Estudar os mecanismos de inibição da β -glicosidase e possíveis alterações na sua estrutura a fim de reduzir a restrição de aplicação e trabalhar também em meios com alto teor de glicose;

- Estudar novas aplicações na indústria de alimentos, principalmente na área de bebidas com relevante potencial aromático.

REFERENCIAS

Akkus et al., Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 7, p.889–894, 2003.

Antalick, G.; Perello,M.C.; de Revel, CG. **Food Chemistry**, n121, p. 1236-1245, 2010.

Barbagallo, R.N. et al. Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 1, p.58–66, 2004.

Belancic, A. et al. β -glucosidase from the grape native yeast Debaryomyces vanrijiae: purification, characterization, and its effect on monoterpane content of a Muscat grape juice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 5, p.1453–9, 2003.

Brady, D.; Jordan, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 11, p. 1639-1650, 2009.

BRENDA. The Comprehensive Enzyme Information System. Disponível em: < <http://www.brenda-enzymes.info/> >. Acesso em: 20/11/2014.

Bruwer, J.; Saliba, A.; Miller, B. Consumer behaviour and sensory preference differences: implications for wine product marketing. **Journal of Consumer Marketing**, v. 28, n. 1, p.5–18, 2011.

Cabaroglu, T. et al., 2003. Wine flavor enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, n.5, p.581–587.

Cao, L. Immobilized enzymes: science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, n. 2, p. 217–226, 2005.

Caldini, C. et al. Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidases for aroma enhancement in wine. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, n.5, p. 286–291, 1994.

Chang, M.Y.; Juang, R.S. Use of chitosan-clay composite as immobilization support for improved activity and stability of β -glucosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n.1, p.93–98, 2007.

Chiou, S.H.; Wu, W.T. 2004. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**, v. 25, n.2, p.197–204, 2004.

Clarcke, R. J.; Bakker, J. **wine flavour chemistry**, p.318, 2004.

DiCosimo, R. et al., 2013. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society reviews**, v.42, n.15, p.6437–74, 2013.

Gallo, L. A. Disponível em:
<http://docentes.esalq.usp.br/luagallo/carboidratos.html> .Acesso em
28/06/2015.

González-Pombo, P. et al. Aroma enhancement in wines using co-immobilized *aspergillus Niger* glycosidases. **Food Chemistry**, v. 143, n.1, p.185–191, 2014.

Gunata, Y.Z. et al. Hydrolysis of grape monoterpenyl β -D-glucosides by various β -glucosidases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, n. 5, p.1232–1236, 1990.

Hakulinen N.; Paavilainen S.; Korpela T, Rouvinen J. The crystal structure of β -glucosidase from *Bacillus circulans* sp. *alkalophilus*: ability to form long polymeric assemblies. **J Struct Biol**, v. 129, p. 69–79, 2000.

Whitaker, J.R.; Voragen A.G.J.; Wong, W.S. **Handbook of Food Enzymology**, 2003.

Homaei, A.A. et al. Enzyme immobilization: an update. **Journal of chemical biology**, v. 6, n. 4, p.185–205, 2004.

Juang, R.S.; Wu, F.C.; Tseng, R.L. Use of chemically modified chitosan beads for sorption and enzyme immobilization. **Advances in Environmental Research**, v. 6, n. 2, p.171–177, 2002.

Katchalski-Katzir, E. Immobilized enzymes: Learning from past successes and failures. **Trends Biotechnol**, v. 11, p. 471–478, 1993.

Krajewska, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p.126–139, 2004.

Lecas, M.; Gunata, Z.Y.; Bayonove, C.L. Purification and partial characterization of β -glucosidase from grape. **Phytochemistry**, v. 30, n.1, p. 451–454, 1991.

Lorenzoni, A.S.G. et al.. Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized β -fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. **Carbohydrate polymers**, v. 103, p.193–7, 2014.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p. 265-275,1951.

Marques, P.R.; Yamanaka, H. Biosensors based on the enzymatic inhibition process. **Química Nova**, v.31, n.7, 2008.

Martino, A.; Pifferi, R.G.; Spagna, G. Immobilization of β -Glucosidase from a Commercial Preparation . Part 2 . Optimization of the Immobilization Process on Chitosan. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 3, p.287–293, 1996.

Mateo, C. et al. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization. **Biochemical Society transactions**, v. 35, n. 6, p.1593–1601, 2007.

Mendes, A.A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Quimica Nova**, Vol. 34, N. 5, p. 831-840, 2011.

Moreno-Arribas, M.V.; Polo, M.C. **Wine Chemistry and Biochemistry**, 2009.

Muzzarelli, R.A.A. Immobilization of enzymes on chitin and chitosan. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 2, n. 3, p.177–184, 1980.

Nawani, N.; Kaur, J. Studies on lipolytic isoenzymes from a thermophilic *Bacillus* sp.: Production, purification and biochemical characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n.4, p.881–887, 2007.

Nicolli, K. Dissertação de mestrado, UFRGS, p.32-50, 2013.

Nisha, S., S, A.K. & Gobi, N. A Review on Methods , Application and Properties of Immobilized Enzyme. **Chemical Science Review and Letters**, v.1, n. 3, p.148–155, 2012.

Njokweni, P.; Rose, S.H.; Van Zyl, W.H. Fungal β -glucosidase expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 39, n. 10, p.1445–52, 2012.

Reshma, R.; Sugunam, S. Improved biochemical characteristics of crosslinked β -glucosidase on nanoporous silica foams. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, p.111–118, 2013.

Rensburg, P; Van Pretorius, I.S. 2000. Enzymes in Winemaking : Harnessing Natural Catalysts for Efficient Biotransformations - A Review. **S Afr. J. Enol. Vitie**, 21.

- Ribereau-Gayon, P. **Handbook of Enology**, v2. ed.2, 2006.
- Rodrigues, R.C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p.6290–307, 2013.
- Sánchez Palomo, E. et al. Contribution of free and glycosidically-bound volatile compounds to the aroma of muscat “a petit grains” wines and effect of skin contact. **Food Chemistry**, v. 95, n.2, p.279–289, 2006.
- Sarry, J.; Gunata, Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors. **Food Chemistry**, v. 87, n. 4, p.509–521, 2004.
- Schöffer, J.D.N. et al. Continuous production of β -cyclodextrin from starch by highly stable cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on chitosan. **Carbohydrate polymers**, v. 98, n. 2, p.1311–6, 2013.
- Sheldon, R.A.; Van Pelt, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 15, p.6223–35, 2013.
- Sheldon, R.A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8-9, p.1289–1307, 2007.
- Shoseyov, O. et al. Immobilized Endo- & glucosidase Enriches Flavor of Wine and Passion Fruit Juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 12, pp. 1387–1390, 1990.
- Soares, R.D. et al., 2015. Monitoring the evolution of volatile compounds using gas chromatography during the stages of production of Moscatel sparkling wine. **Food chemistry**, v. 183, p.291–304.
- Soares, R.D. Dissertação de mestrado, UFRGS, p.38-50, 2012.

Spagna, G. et al. A mixture of purified glycosidases from *Aspergillus niger* for oenological application immobilised by inclusion in chitosan gels. **Enzyme and microbial technology**, v. 30, pp.80–89, 2002.

Spagna, G. et al. 2000. A simple method for purifying glycosidases: alpha-l-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of Moscato wine. **Enzyme and microbial technology**, v. 27, n. 7, p.522–530, 2000.

Su, E. et al., 2010. Immobilization of β -glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, n. 2-3, p.83–89, 2010.

Vieira, M.F. et al. β -Glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reactive groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, n. 1-2, p.47–53, 2011.

Wang, Y. et al. Different influences of β -glucosidases on volatile compounds and anthocyanins of Cabernet Gernischt and possible reason. **Food Chemistry**, v. 140, n. 1-2, p.245–254, 2013.

Wang, Y.; Xu, Y.; Li, J. A novel extracellular β -glucosidase from *Trichosporon asahii*: yield prediction, evaluation and application for aroma enhancement of Cabernet Sauvignon. **Journal of food science**, v. 77, n. 8, p.505–15, 2012.

Watanabe, T. et al. Purification and properties of *Aspergillus niger* β -glucosidase. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, n. 2, p. 651-659, 1992.

Williams, P.J. et al. Studies on the hydrolysis of *Vitis vinifera* monoterpenoid precursor compounds and model monoterpenoid β -D-glucosides rationalizing the monoterpenoid composition of grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, p. 1219-1223, 1982.

Zhang, C. et al. Purification and characterization of piceid- β -d-glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 1, p.83–88, 2007.

Zhang, J. et al. Efficient resveratrol production by immobilized β -glucosidase on cross-linked chitosan microsphere modified by L-lysine. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 104, p.29–34, 2014.

Zhou, Y. et al. Optimal immobilization of β -glucosidase into chitosan beads using response surface methodology. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 6, , 2013.