

PROPRIEDADES E CARACTERÍSTICAS DAS MANOPROTEINAS EXTRAÍDAS DAS PAREDES DE LEVEDURAS

Denis DUBOURDIEU et Virginie MOINE-LEDOUX*

Faculté d'Œnologie - Université Victor Segalen Bordeaux II

O efeito das macromoléculas normalmente definidas como “colóides protectores” na estabilidade dos vinhos é discutido há muito tempo em enologia (Ribéreau-gayon, 1933). Durante alguns anos, tentaram-se eliminar estes colóides de estabilização que prejudicam a eficácia dos tratamentos físicos, sobretudo através de clarificações e filtrações acentuadas (Feuillat *et al.*, 1987). Algumas destas macromoléculas têm origem directamente da uva, como é o caso dos taninos, dos polissacáridos pécticos e das proteínas. Outras são de origem fúngica, como é o caso dos glucanos da *Botrytis cinerea* ou das manoproteínas libertadas pelas leveduras ao longo da fermentação alcoólica (Llauberes, 1988) ou da autólise (Feuillat *et al.*, 1989). Estas apresentam propriedades estabilizantes ao nível das precipitações proteicas (Ledoux *et al.*, 1992; Waters *et al.*, 1993) e das precipitações tartáricas (Lubbers *et al.*, 1993 ; Moine-Ledoux *et al.*, 1997), explicando a melhoria espontânea da estabilidade proteica e tartárica dos vinhos brancos durante o estágio em contacto com as borras (Moine et Dubourdieu, 1995).

I – Interpretação molecular da melhoria da estabilidade proteica dos vinhos brancos ao longo do estágio em contacto com as borras.

A melhoria sistemática da estabilidade proteica dos vinhos brancos durante o seu estágio em vasilhame de madeira, em contacto com as borras, é um fenómeno particularmente fácil de verificar na prática. Curiosamente, este fenómeno nunca foi referido na bibliografia antes dos trabalhos de Ledoux et al. (1992). Manter, os vinhos jovens, em contacto com as borras, faz com que estes turbem, cada vez menos, sob o efeito do calor; e conseqüentemente, a obtenção da sua estabilidade proteica requer doses de bentonite menos elevadas. Assim, um vinho de Sauvignon, trasfegado após a fermentação, que tenha sido tratado com 120 g/hL de bentonite para evitar a casse proteica, torna-se praticamente estável após 10 meses em contacto com as borras, com uma ligeira adição de bentonite na dose de 30-40 g/hL (Tabela I). Portanto, as proteínas da uva responsáveis pela casse proteica dos vinhos brancos nem são digeridas nem adsorvidas pelas borras das leveduras durante o estágio; elas tornam-se termoestáveis na presença de certas colóides provenientes das paredes de leveduras.

	Turbidez (NTU)	Bentonite (g/hL)
Fim da fermentação alcoólica	38	120
Após 10 meses de estágio em contacto com a totalidade das borras	12	40

Tabela I : Evolução da estabilidade proteica de um vinho estagiado em madeira em contacto com a totalidade das borras

I-1 Os vinhos estagiados em contacto com as borras contêm uma proteína particular que é termoestável.

As proteínas responsáveis pela casse proteica de um vinho de Sauvignon logo após a fermentação podem ser separadas por electroforese capilar em 6 espécies principais presentes no mosto (Figura 1). No mesmo vinho estagiado em contacto com as borras aparece, após alguns meses de estágio, uma fracção proteica suplementar, representada na figura 1b pelo pico 7.

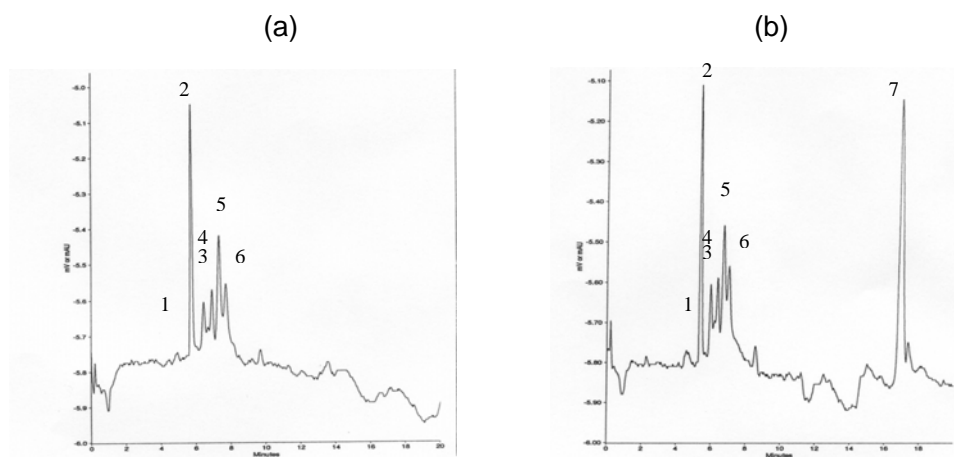


Figura 1: Electroforegrama das proteínas de um vinho de Sauvignon após fermentação alcoólica (a) depois de 10 meses de estágio sobre borras (b).

Contrariamente às proteínas provenientes da uva, este composto é termoestável e não pode ser adsorvido pela bentonite. Esta manoproteína põe de parte a ideia, de que, os perfis proteicos de um vinho que estagiou na ausência ou em contacto com as borras são idênticos.

Foi colocada a hipótese de que o pico 7 desempenhe um papel fundamental na melhoria da estabilidade proteica dos vinhos estagiados em contacto com as borras. Consequentemente, tentou-se purificar, identificar e compreender quais os mecanismos responsáveis pelo aparecimento deste pico nos vinhos estagiados em contacto com as borras.

I-2 A proteína termoestável e termoestabilizante dos vinhos estagiados em contacto com as borras é uma manoproteína de 32 KDa denominada MP32.

Numa primeira fase, demonstrou-se que este composto pode ser extraído das paredes de leveduras por digestão com uma preparação enzimática particular, a Glucanex, autorizada em enologia como enzima de clarificação para hidrolizar o glucano dos vinhos provenientes de uvas botritizadas. Digeridas pela acção da Glucanex, as paredes das leveduras libertam, por conseguinte, uma mistura de manoproteínas contendo o famoso pico 7. As manoproteínas extraídas enzimaticamente das paredes das leveduras (MPEE) são capazes de reduzir para metade a dose de bentonite (25 g/hL), necessária para a estabilização proteica de um vinho com grande tendência para casse (Tabela II).

O composto correspondente ao pico 7 foi purificado em 2 etapas por cromatografia de troca de iões em DEAE sefarose e depois por cromatografia de afinidade em Concanavalina A. A percentagem do pico 7

nos produtos purificados, bem como a sua actividade estabilizante expressa pela percentagem de diminuição da dose de bentonite necessária à estabilização de um vinho com casse tratado, aumenta ao longo da purificação (Tabela II).

	% Pico 7	% de actividade estabilizante
MPEE	18	50
DEAE 0,25 M	20	65
Com A FR	60	100

Tabela II : Concentração do pico 7 e actividade termoestabilizante de extractos de manoproteínas obtidas por digestão enzimática (MPEE) e das fracções purificadas por cromatografia de troca de iões em DEAE sefarose (DEAE 0,25 M) após cromatografia de afinidade em Concanavalina A (Com A FR).

O produto termoestabilizante purificado é uma manoproteína de 31.8 KDa que denominamos como MP32, sendo constituído por 27% de proteínas e 32% de manose.

I-3 MP32 é um fragmento da invertase.

Visto que, foram descritas, um grande número de manoproteínas parietais na bibliografia (Klis, 1994), procuramos identificar a MP32. Deste modo, foi sequenciado um fragmento desta manoproteína gerada por digestão com a acção da endoprotease Lys C. A sua sequência peptídica é a seguinte: VFWYEPSQK (Val-Phe-Trp-Tyr-Glu-Pro-Ser-Gln-Lys). Esta, foi comparada com a sequência peptídica de diversas proteínas, tendo-se verificado que esta sequência é 100% homóloga com uma glicoproteína parietal de *Saccharomyces cerevisiae*, a invertase, e corresponde aos ácidos aminados 174 a 182 (figura 2). Esta sequência procede uma lisina, sítio de clivagem para a endoprotease lys C utilizada no sequenciamento do MP32. Considerando também a lisina, MP32 e a invertase de *Saccharomyces cerevisiae* possuem a mesma sequência de 10 ácidos aminados.

151 yftfeyqknp vlaanstqfr dpqvfwyeps qkwimtaaks qdykieiyss 200
174 182

Figura 2: Sequência dos ácidos aminados da invertase.

Contudo, a massa molecular de MP32, cerca de 32000 Da e a da invertase, 270000 Da, são muito diferentes. Provavelmente, MP32 é um fragmento da invertase.

I-4. Durante a autólise das borras, MP32 é libertada da parede de leveduras por acção conjunta das suas glucanases e das suas proteases. MP32 *In vitro* pode ser obtida por hidrólise da invertase por acção da Glucanex.

Ao longo da autólise das leveduras durante o estágio, em contacto com as borras, duas proteases da levedura podem *a priori* digerir a invertase: a protease A e a carboxipeptidase Y. No caso da hidrólise das paredes por intermédio da Glucanex, a protease ácida (Dulau, 1990) contida nesta preparação é também, teoricamente capaz de hidrolisar a invertase. Com o objectivo de verificar estas hipóteses, foi hidrolisada uma preparação comercial de invertase (I) por acção da protease A, a carboxipeptidase Y e pela Glucanex. Estes hidrolisados (IPA, ICY e IG) foram adicionados (25 g/hL) a um vinho, o efeito destas adições sobre a estabilidade proteica e a dose de bentonite necessária para o estabilizar foi comparado ao

das manoproteínas extraídas enzimaticamente das paredes de leveduras por acção da Glucanex (MPEE) (Tabela IV).

	Turbidez (NTU)	Bentonite (g/hL)
Vinho testemunha	16	60
Vinho + 25 g/hL MPEE	10	30
Vinho + 25 g/hL IPA	2	0
Vinho + 25 g/hL ICY	7	20
Vinho + 25 g/hL IG	2	0

Tabela IV : Estabilização proteica induzida por adição de diferentes hidrolisados.

O hidrolisado obtido por acção da protease A (IPA) manifesta uma actividade termoestabilizante significativa. A turbidez do vinho aquecido diminui de 16 para 2 NTU, eficácia comparável à dos hidrolisados por acção da Glucanex (IG). A eficácia do hidrolisado por acção da carboxipeptidase Y (ICY) é menos significativa.

Além disso, a análise por electroforese capilar (Tabela V) destes diferentes hidrolisados por acção da invertase, mostra que estes contêm efectivamente MP32 como MPEE. O hidrolisado obtido por acção da protease A é ligeiramente mais rico do que o hidrolisado obtido por acção da Glucanex.

	MP32 %
Manoproteínas extraídas enzimaticamente	18
Hidrolises de invertase por acção da Glucanex	60
Hidrolises da invertase por acção da protease A	65
Hidrolises da invertase por acção da carboxipeptidase Y	33

Tabela V : Teor em MP32 de MPEE e dos diferentes hidrolisados enzimáticos de invertase.

Estas experiências associadas aos resultados do sequenciamento demonstram claramente que MP32 é um fragmento da invertase. A sua libertação ao longo do estágio em contacto com as borras resulta da acção conjunta das -glucanases parietais e da protease A do vacúolo da levedura. O procedimento de extracção desenvolvido evidencia as mesmas actividades enzimáticas (glucanases e protease) indispensáveis à extracção a partir de paredes do fragmento de invertase. Este método, exequível à escala industrial, foi tema para registo de uma patente (Moine et Dubourdieu, 1996).

De um ponto de vista prático, a melhoria da estabilidade proteica ao longo do estágio dos vinhos brancos em vasilhame de madeira é fortemente influenciada por diferentes parâmetros: a duração do estágio, a quantidade de borras, a idade do vasilhame e a frequência das *battonages*. Em Bordeaux, é necessário esperar pelo mês de Junho para que os vinhos estagiados sobre a totalidade das borras em barricas de um ano necessitem menos de 40 g/hL de bentonite para estabilizarem (Figura 3^a). Estes contêm aproximadamente 15 a 18 mg/L de MP32 (figura 3b), quantidade suficiente para diminuir em 75% a dose de bentonite. Esta melhoria espontânea da estabilidade proteica do vinho, ao longo do seu estágio, é mais rápida em barris usados do que em barris novos; é igualmente acelerada pela frequência das *battonages*. Assim, de Novembro a Junho, uma *battonage* semanal dos vinhos em barris novos permite reduzir a dose de bentonite em 40%; nas mesmas condições, uma *battonage* bimensal não diminui para além de 20% a dose de bentonite a utilizar. (Figura 4).

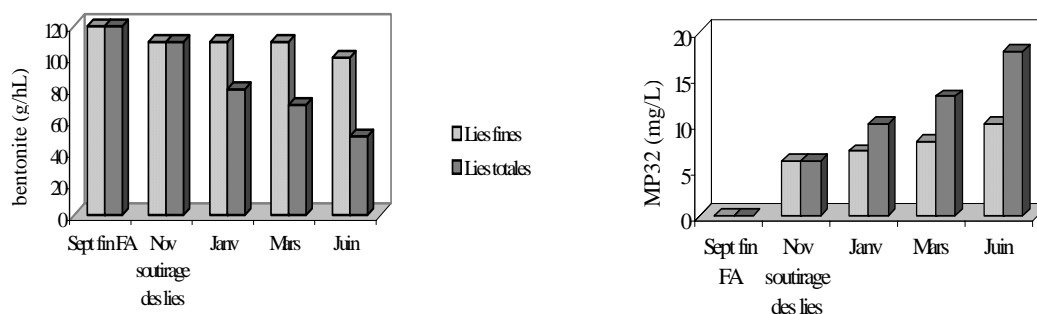


Figura 3 : Evolução da dose de bentonite (a) e da concentração em MP32 (b) ao longo do estágio em contacto com as borras finas ou sobre a totalidade das borras.

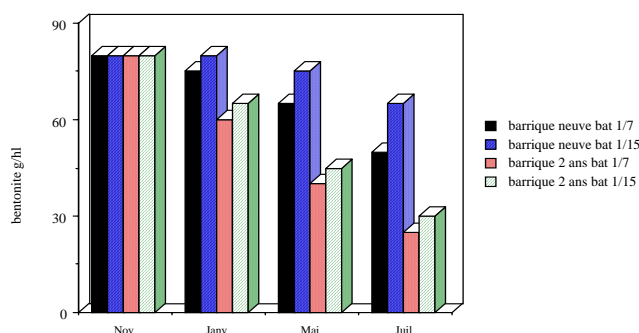


Figura 4 : Incidência da frequência de batonnage sobre a evolução da dose de bentonite ao longo do estágio em contacto com as borras.

II) Papel das manoproteínas de leveduras na estabilidade tartárica dos vinhos.

Nas concentrações habitualmente encontradas nos vinhos, as macromoléculas, denominadas de colóides protectores, retardam a cristalização dos sais de ácido tartárico sem os inibir totalmente. Poucos trabalhos experimentais tentaram isolar, do vinho, estes compostos inibidores das cristalizações e explorar as suas propriedades estabilizantes.

II-1. Os vinhos brancos conservados, vários meses, em contacto com a totalidade das borras, adquirem uma estabilidade tartárica que lhes dispensa os tratamentos pelo frio.

Trata-se de uma observação prática muito difundida que até agora não tinha sido alvo de explicação científica. Assim, em Bordeaux, a maior parte dos vinhos brancos secos estagiados em contacto com as borras que não estão estáveis no mês de Março após o seu primeiro Inverno, tornam-se estáveis no mês de Junho ou Julho sem frio suplementar (Tabela VI). No entanto, vinhos provenientes de mostos idênticos, mas que não estagiam em contacto com as borras têm que ser sistematicamente tratados pelo frio para obter a sua estabilidade ao nível das cristalizações tartáricas, demonstrando que, algumas macromoléculas, provavelmente as manoproteínas – derivadas de leveduras nas condições normalmente praticadas de estágio em borras – são substâncias inibidoras de cristalização.

amostra	Março	Junho
Graves 1-94	***	0
Graves 2-94	***	0
Bordeaux 94	***	0
Graves 1-95	***	0
Graves 2-95	***	0
Bordeaux 95	***	0

*** : presença de cristais 0 : ausência de cristais.

Tabela VI : Evolução da estabilidade tartárica estimada pelo teste ao frio (6 dias a -4°C) de diferentes vinhos brancos estagiados em borras ao longo de 2 colheitas.

II-2. Algumas manoproteínas extraídas por acção da glucanex das paredes de leveduras são inibidoras de cristalização.

A descoberta do efeito inibidor de cristalização das manoproteínas extraídas por via enzimática das paredes de leveduras foi uma consequência imprevista do nosso trabalho sobre a estabilização proteica.

As preparações de manoproteínas obtidas em laboratório por digestão das paredes de leveduras por acção da Glucanex inibem as cristalizações tartáricas nos vinhos brancos, tintos e rosés durante um período de 6 dias a -4°C, enquanto que, à mesma dose (25 g/hl) as manoproteínas extraídas por acção do calor não têm qualquer tipo de efeito estabilizante (Tabela VII).

vinhos	branco 1	branco 2	rosé 1	rosé 2	tinto 1	tinto 2
Testemunha	***	***	***	***	***	***
MEC 25 g/hl	***	***	***	***	***	***
MPEE 25 g/hl	0	0	0	0	0	0

*** : presença de cristais 0 : ausência de cristais

Tabela VII : Comparação do efeito estabilizante, pelo teste ao frio, das manoproteínas extraídas a quente (MEC) e das manoproteínas extraídas enzimaticamente (MPEE).

II-3. Caracterização molecular das manoproteínas responsáveis pela estabilização tartárica.

A partir das manoproteínas extraídas por digestão enzimática das paredes, procuramos isolar as que possuem uma actividade inibidora das precipitações tartáricas. Por isso, separamos, numa primeira fase, as manoproteínas de acordo com a sua dimensão por cromatografia líquida de elevado desempenho de tamisagem molecular em 2 fracções P1 e P2 (figura 5). As 2 fracções isoladas foram adicionadas em doses crescentes num vinho que seguidamente foi sujeito a um teste ao frio (figura 6).

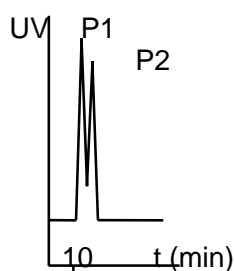


Figura 5 : Fracçãoamento por tamisagem molecular das manoproteínas extraídas enzimaticamente das paredes de leveduras.

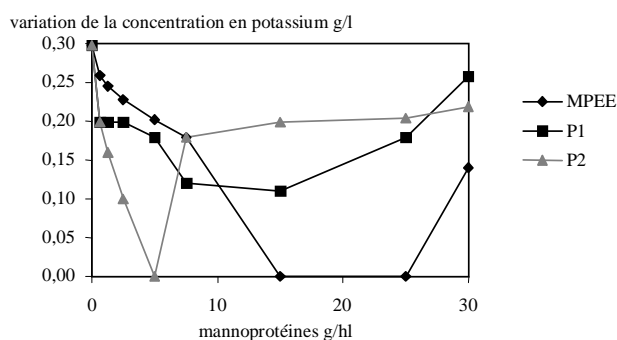


Figura 6 : Influência da adição de MPEE, P1 e P2 na estabilidade tartárica de um vinho branco

A fracção P1 não inibe a cristalização. Pelo contrário, a fracção P2 correspondente à das moléculas compreendidas entre 30 e 50 KDa é activa a 5 g/hL. De facto, para esta dose, a diferença de concentração em potássio antes e depois da passagem pelo frio é nula, prova da inibição da precipitação de hidrogenotartarato de potássio. É de salientar que, a adição de manoproteínas numa dose muito elevada, para este vinho, 30 g/hL, provoca um efeito de sobredosagem, o que significa, que o vinho se torna de novo instável. A fracção P2 activa é novamente purificada por cromatografia de afinidade em gel de Concanavalina A. Obtém-se uma fracção não retida (Com A FNR), pouco glicosilada, e uma fracção retida (Com A FR) fortemente glicosilada eluída em 0,5 M de -D-méthil-manósido. As 2 fracções separadas foram adicionadas a um vinho que de seguida foi sujeito a um teste ao frio (figura 7).

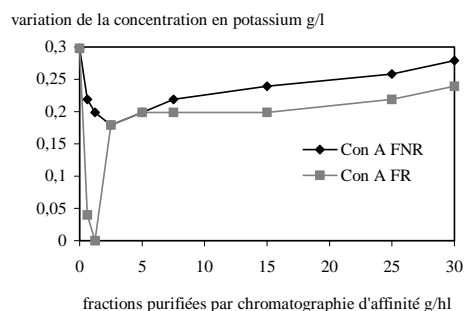


Figura 7 : Influência da adição das fracções separadas por cromatografia de afinidade sobre a estabilidade tartárica de um vinho branco.

Somente a fracção retida previne a cristalização através de uma adição especialmente fraca (12,5 mg/L). Esta fracção, possuindo um forte poder inibidor, é composta por manoproteínas fortemente glicosiladas de massa molecular compreendida entre 30 e 40 KDa. A necessidade de activar as glucanases para extrair estas manoproteínas da parede, sugere que existem ligações covalentes destas com o glucano. Para além de que, estas estão alojadas nas paredes tratadas com SDS e com β-mercaptoétanol (figura 8), agentes químicos que não afectam as ligações oxidásicas.

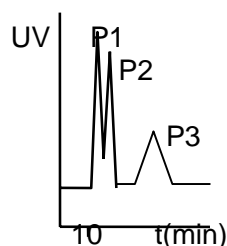


Figura 8 : Análise por HPLC de tamisagem molecular de um extracto manoproteico obtido por digestão enzimática das paredes pré-tratadas com SDS e β -mercaptoéтанol.

A presença do pico 2 correspondente à eluição da manoproteína responsável pela estabilização tartárica confirma que a ligação é covalente. Entre as manoproteínas unidas por uma ligação covalente com os glucanos, algumas possuem também um tipo de glicosilação particular, uma âncora de glicosilfosfatidilinositol. A utilização de uma estirpe mutante (FBYII) deficiente em manoproteínas com a âncora de (GPI) quando é cultivada a 37°C (FBYII-37) permite mostrar que as manoproteínas responsáveis pela estabilização tartárica possuem este tipo de glicosilação. Dois tipos de extractos manoproteicos são obtidos por hidrólise enzimática das paredes de leveduras (FBYII) cultivadas a 24°C ou a 37°C.



Figura 9 : Análise por HPLC de tamisagem molecular de extractos manoproteicos obtidos por hidrólise enzimática das paredes de leveduras FBYII-24 (a) e FBY-II37 (b).

A análise por HPLC dos 2 extractos (figura 9) mostra que o pico 2 não existe no caso em que as paredes sejam obtidas a partir de leveduras cultivadas a 37°C, ou seja, com deficiência de em manoproteínas com a âncora de GPI. O resultado mostra por um lado que as manoproteínas responsáveis pela estabilização tartárica são as manoproteínas com âncora GPI e permite por outro lado explicar o facto de, estas serem apenas extraíveis por digestão enzimática.

Concluindo, estes trabalhos recentes explicam de forma mais clara os mecanismos de estabilização espontânea (proteica e tartárica) dos vinhos brancos ao longo do estágio em barrica, em contacto com as borras. Estes conhecimentos apontaram novos caminhos para um desenvolvimento tecnológico potencial particularmente importante para a estabilização tartárica de todos os vinhos. De facto, à excepção dos grandes vinhos brancos de *guarda* conservados em madeira, quase um ano em contacto com as borras, todos os outros vinhos brancos e rosés, assim como, a maior parte dos vinhos tintos, são instáveis do ponto de vista das precipitações tartáricas no fim do estágio; a possibilidade de os estabilizar sem recorrer ao tratamento pelo frio, mas unicamente à adição de um colóide protector biológico e estável, que faz parte da sua composição natural, é perfeitamente possível a curto prazo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DUBOURDIEU D. et MOINE V. **1995**, In : *Oenologie 95* Lavoisier TEC et DOC Ed.,, 385-390.
- DUBOURDIEU D. et MOINE V. Produit biologique pour la stabilisation physico-chimique d'un vin. Brevet français n° 94 13261.
- DUBOURDIEU D. et MOINE V. Produit de stabilisation protéique des vins. Brevet français n° 96 08187.
- DULAU D. **1990**, Thèse de Doctorat de l'Université de Bordeaux II.
- FEUILLAT M., PEYRON D. et BERGER J. L. **1987**, Bull. *O.I.V.*, 673-674.
- FEUILLAT M., FREYSSINET M. et CHARPENTIER C. **1989**, *Vitis*, 28, 161-176.
- KLIS F. M. **1994**, *YEAST*, 10, 851-869.
- LEDOUX V., DULAU L. et DUBOURDIEU D. **1992**, *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 26, 239-251.
- LUBBERS 1993
- LLAUBERES 1988
- NEUMANN B. et LAMPEN J. O. **1967**, *Biochemistry*, 6, 468.
- RIBEREAU-GAYON J., **1933**, Bull. Soc. Chim., 53, 1162.
- WATERS E. J., WALLACE W., TATE M. E. et WILLIAMS P.. **1993**, *J. Agric. Food. Chem*, 41, 724-730.