

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

UTILIZAÇÃO DE EXTRATOS DE LEVEDURAS *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE NA ELABORAÇÃO DE VINHOS ESPUMANTES

Jean Philippe Palma Révillion
Especialista em Viticultura e Enologia (ENSAM)

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do
Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente
(ênfase em Microbiologia de Alimentos)

Porto Alegre (RS) , Brasil
Dezembro, 1995

AGRADECIMENTOS

Ao professor **Marco Antônio Záchia Ayub**, pela orientação e amizade dispensadas durante a realização do curso.

Ao professor **João Giuliani Filho**, pelo estímulo e amizade dispensados desde o período do curso de agronomia, que promoveram o interesse pela ciência enológica.

À colaboradora e amiga **Cristiane Cassales Pibernat**, cuja dedicação e determinação foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos **professores e funcionários** do curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, da Faculdade de Agronomia e do ICTA (Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos) da UFRGS, que colaboraram e incentivaram no transcorrer do curso.

Em especial, à bibliotecária do ICTA, **Márcia Raimundo Bernardes**, cuja disposição e profissionalismo foram muito importantes na confecção desta dissertação.

Ao **Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq)** cuja contribuição tornou possível a realização deste trabalho.

Instituto de Ciências e
Tecnologia de Alimentos
Biblioteca

UTILIZAÇÃO DE EXTRATOS DE LEVEDURAS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* NA ELABORAÇÃO DE VINHOS ESPUMANTES¹

Autor: Jean Philippe Palma Révillion

Orientador: Prof. Marco Antônio Záchia Ayub

Co-Orientador: Prof. João Giuliani Filho (*in memorium*)

SINOPSE

O processo de autólise de células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* durante a elaboração de vinhos espumantes é um dos fatores fundamentais na determinação da qualidade do produto. O presente trabalho objetivou desenvolver um processo que possibilita a obtenção e utilização no vinho espumante de um extrato de leveduras, de maneira a acelerar ou incrementar o fenômeno de autólise, almejando-se um produto final de maior qualidade em menos tempo e a um menor custo. A cepa de *S. cerevisiae* Uvaferm CGC62 da empresa Danstar Fermant-L'Allemand foi recolhida na fase estacionária de crescimento. A biomassa foi submetida a diversos ensaios, de maneira a testar o efeito da temperatura no processo de autólise e a eficiência de diversos métodos físicos e químicos de ruptura ou permeabilização do envelope celular. Posteriormente, foram adicionados extratos de leveduras (obtidos nas melhores condições de tratamento testados anteriormente) em um "vinho espumante artificial" em maturação de maneira a testar o seu efeito. Foram analisados a proteína solúvel e a atividade enzimática intracelular como indicadores da eficiência dos diferentes tratamentos. Os métodos físicos de ruptura do envelope celular (pérolas de vidro, sonicador, moinho coloidal) mostraram-se muito mais eficientes do que o uso do etanol como agente permeabilizador e não diferiram grandemente entre si. Altas temperaturas de tratamento (40-50°C) provocaram uma maior liberação de compostos nitrogenados da célula de levedura, porém levaram a uma maior inativação enzimática, o que não ocorreu em temperaturas mais baixas. Resolveu-se, então, comparar o efeito da adição no "vinho espumante artificial" de extratos obtidos a 20°C, rico enzimaticamente, e a 40°C, com baixa atividade enzimática, mas com grande riqueza em compostos nitrogenados. O extrato obtido a 40°C foi mais eficiente no enriquecimento do "vinho espumante" em compostos intracelulares de potencial qualitativo durante um período de 3 meses.

1/ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (Microbiologia de Alimentos), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. (138p.) - Dezembro, 1995.

UTILIZATION OF YEAST EXTRACTS FROM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* IN THE PROCESS OF ELABORATION OF SPARKLING WINES¹

Authoress: Jean Philippe Palma Révillion

Orientated by: Prof. Marco Antônio Záchia Ayub

Co-Orientated by: Prof. João Giuliani Filho (*in memorium*)

SYNOPSIS

The process of cell autolysis of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during the elaboration of sparkling wines is one of the most important factors affecting the quality of the product. The aim of this research was to develop a process which allows the obtention and the use of yeast extracts in sparkling wines in order to speed up or increase the phenomenon of autolysis in such a way that a gain in quality could be obtained in a shorter time and also be more economical. The UVAFERM CGC62 strain of *S. cerevisiae* produced by Danstar Fermant-L'Allemand was harvested in the stationary phase of growth. The biomass was submitted to several treatments in order to study the effect of temperature in the process of autolysis along with the efficiency of several physico and chemical methods of cell envelop breakdown or permeabilization. Yeast extract obtained under the best conditions among the tested treatments was added to "artificial sparkling wine" under maturation. Soluble protein and intracellular enzymatic activity were analysed as a way to access efficiency factors for the treatments. The physical methods of cell breakdown (glass beads, sonicator, homogenizer) showed to be much more efficient than the use of ethanol as a permeabilizer and, were very alike. Temperatures of treatment around 40-50 °C promoted a higher liberation of nitrogen compounds from cells causing however a higher enzyme inactivation, not observed when lower temperatures were used. Both extracts were used and their effects were compared. During a period of three months, the high temperature extract showed to be more efficient as to the enhancement of the contents of intracellular compounds of the sparkling wine with quality potential.

1/ Dissertation of master in Microbiology Agricultural and Environment (Food Microbiology), Agronomy Faculty, Federal University of Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, (138 p.), december, 1995.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 Variações morfológicas da célula de levedura durante o processo de autólise.....	6
2.2 Efeitos qualitativos do processo de autólise de leveduras no vinho espumante.....	8
2.2.1 Efeito qualitativo da liberação colóides.....	8
2.2.2 Efeito qualitativo da liberação de ácidos graxos.....	10
2.2.3 Efeito qualitativo da formação de gases derivados do enxofre.....	11
2.2.4 Efeito qualitativo da liberação de compostos nitrogenados de baixo peso molecular.....	12
2.2.5 Efeito qualitativo da formação de ésteres e terpenos.....	17
2.3 Fatores do processo de autólise de leveduras nos vinhos espumantes.....	19
2.3.1 Influência da temperatura.....	19
2.3.2 Influência do pH.....	24
2.3.3 Influência do teor alcóolico.....	25
2.3.4 Influência de fatores fisiológicos.....	26
2.4 Características das atividades enzimáticas no processo de autólise.....	30
2.4.1 Proteases envolvidas e sua importância relativa.....	30
2.4.2 Ação proteolítica extra-celular.....	35
2.4.3 Ação de b-glucanases.....	36
2.4.4 Ação de lipases e nucleases.....	37
2.5 Fases da autólise nos vinhos espumantes.....	38
2.6 Opções de otimização da autólise de leveduras nos processos de elaboração de vinhos espumantes.....	44
2.6.1 Homogeneizações da biomassa com o vinho espumante.....	44
2.6.2 Tratamento térmico do vinho espumante em contato com as leveduras...	44
2.6.3 Adição de extratos de leveduras.....	46
2.6.3.1 Efeitos da adição de extratos de leveduras aos vinhos espumantes.....	47
2.6.3.2 Fatores bioquímicos a considerar na obtenção de extratos de leveduras.....	52
2.6.3.3 Características qualitativas desejáveis em um extrato de leveduras.....	55

3. MATERIAL E MÉTODOS	58
3.1 Materiais de experimentação.....	58
3.1.1 Microrganismos.....	58
3.1.2 Meios de cultura.....	58
3.1.3 Tampões e soluções padrões.....	58
3.1.3.1 Tampão hidroalcoólico.....	58
3.1.3.2 Tampão fosfato.....	59
3.2 Método de crescimento da cultura de células.....	59
3.3 Método de recuperação da biomassa.....	60
3.4 Método de ressuspensão da biomassa.....	60
3.5 Métodos de ruptura ou permeabilização do envelope celular.....	60
3.5.1 Uso de pérolas de vidro.....	61
3.5.2 Sonicador.....	63
3.5.3 Moinho de vibração coloidal.....	64
3.5.4 Etanol absoluto (FENTON, 1982).....	65
3.6 Método de realização dos tratamentos térmicos.....	66
3.7 Métodos de análise.....	69
3.7.1 Análise da atividade enzimática pelo método de Grzywnowicz (GRZYWNOWICZ et al. 1989).....	69
3.7.2 Análise da proteína solúvel pelo método de Lowry (SCOPES, 1994).....	70
3.8 Métodos de análise estatística dos resultados	72
3.8.1 Análise da variância.....	72
3.8.2 Teste de Duncan	72
3.9 Classificação dos ensaios.....	73
3.9.1 Ensaios para determinar a eficiência de métodos de ruptura e permeabilização do envelope de células de leveduras.....	73
3.9.2 Ensaios para determinar as condições de obtenção do extrato de leveduras.....	74
3.9.2.1 Aproximação do tratamento térmico ideal para ativação das proteases intracelulares e do pH do sobrenadante para atuação destas, provocando a hidrólise e liberação destas.....	74
3.9.2.2 Aproximação do período de maturação ideal das células para a obtenção de um extrato de leveduras rico em proteases e compostos intracelulares.....	75
3.9.3 Ensaios para determinar a eficiência da utilização de extratos de levedura na otimização do processo de maturação de vinhos espumantes.....	77

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
4.1. Ensaio para determinar a eficiência de métodos de ruptura e permeabilização do envelope de células de leveduras.....	80
4.1.1 Discussão dos resultados.....	83
* 4.2. Ensaio para determinar as condições de obtenção do extrato de leveduras.....	85
4.2.1. Aproximação do tratamento térmico ideal para ativação das proteases intracelulares e do pH do sobrenadante para atuação destas, provocando a hidrólise e liberação de compostos intracelulares.....	85
4.2.1.1 Discussão dos resultados.....	87
4.2.1.2 Discussão dos resultados.....	91
* 4.2.2. Aproximação do período ideal de maturação das células para a obtenção de um extrato de leveduras rico em proteases e compostos intracelulares.....	93
4.2.2.1 Discussão dos resultados.....	95
4.2.2.2 Discussão dos resultados.....	98
4.3 Ensaio para determinar a eficiência da utilização de extratos de leveduras na otimização do processo de maturação de vinhos espumantes.....	99
4.3.1 Discussão dos resultados.....	101
4.3.2 Discussão dos resultados.....	104
5. CONCLUSÕES.....	105
* 5.1 Seleção do método de ruptura do envelope celular de células de <i>S. cerevisiae</i>	105
5.2 Seleção do método de obtenção do extrato de leveduras.....	105
5.3 Seleção do método de utilização de extratos de leveduras na otimização do processo de maturação de vinhos espumantes.....	107
6. PERSPECTIVAS.....	108
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
8. APÊNDICES.....	119

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

* 1. Propriedades de autolisados de leveduras obtidos segundo diferentes temperaturas de tratamento.....	23
2. Características de quatro enzimas proteolíticas liberadas durante a autólise de leveduras.....	31
* 3. Proteases da levedura <i>S. cerevisiae</i> (reprodução parcial).....	32
* 4. Inibidores macromoleculares das proteases na levedura.....	34
5. Evolução da proteólise intracelular das leveduras durante o processo de elaboração de vinhos espumantes.....	40
* 6. Liberação de nitrogênio total, aminado e aminoácidos pelas leveduras após 7 e 120 dias de autólise a 15°C	43
7. Dosagem dos aminoácidos de um vinho espumante enriquecido ou não de autolisados de leveduras na dose de 1 g/l.....	48
8. Avaliação sensorial de um vinho espumante após 36 meses de envelhecimento sobre as leveduras.....	50
9. Comparação do grau de autólise da célula de levedura em relação ao volume de cultura e das condições de crescimento.....	53
* 10. Comparação de procedimentos de autólise de células de <i>S. cerevisiae</i>	62

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Evolução dos compostos nitrogenados no vinho espumante, nos ensaios com diferentes cepas de leveduras e diferentes métodos de propagação.....	13
2. Evolução das atividades proteolíticas intracelulares durante a maturação dos ensaios com diferentes cepas de leveduras e diferentes métodos de propagação.....	41
3. Esquema do estator e do rotor do moinho de vibração coloidal.....	65
4. Representação esquemática dos processos de obtenção dos extratos celulares.....	68
5. Curva padrão de BSA.....	71
6. Eficiência dos métodos de ruptura e permeabilização do envelope celular de <i>S. cerevisiae</i> representada pela liberação de proteases no sobrenadante após um pré-tratamento das células à -5°C/24h em tampão fosfato de pH 7,0.	81
7. Eficiência dos métodos de ruptura e permeabilização do envelope celular de <i>S. cerevisiae</i> representada pela liberação de proteases no sobrenadante após um pré-tratamento das células à 30°C/24h em tampão fosfato de pH 7,0.....	82
8. Influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10 % vol) de pH 3,0 na inibição das proteases de células de <i>S. cerevisiae</i> . O extrato celular foi obtido em duas condições de pH: um em tampão fosfato de pH 7,0 e outro em tampão hidroalcoólico de pH 3,0.....	86
9. Influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10 % vol) de pH 3,0 na liberação de compostos nitrogenados intracelulares de baixo peso molecular de células de <i>S. cerevisiae</i>	88

10. Influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10 % vol) de pH 3,0 na hidrólise de compostos nitrogenados intracelulares de células de <i>S. cerevisiae</i> . Ruptura celular em pH 3,0.....	89
11. Influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10 % vol) de pH 3,0 na hidrólise de compostos nitrogenados intracelulares de células de <i>S. cerevisiae</i> . Ruptura celular em pH 7,0.....	90
12. Evolução da atividade proteásica intracelular em função do tempo de maturação das células de <i>S. cerevisiae</i> no "vinho espumante".....	94
13. Evolução da concentração de compostos nitrogenados de baixo peso molecular no "vinho espumante" em função do tempo de maturação das células de <i>S. cerevisiae</i>	96
14. Evolução da concentração de compostos nitrogenados intracelulares de baixo peso molecular em função do tempo de maturação das células de <i>S. cerevisiae</i> no "vinho espumante".....	97
15. Evolução da atividade proteásica no "vinho espumante" em função do tempo de maturação das células de <i>S. cerevisiae</i> e dos tratamentos.....	100
16. Evolução da concentração de compostos nitrogenados de baixo peso molecular no "vinho espumante" em função do tempo de maturação das células de <i>S. cerevisiae</i> e dos tratamentos.....	102
17. Evolução da concentração de compostos nitrogenados intracelulares de baixo peso molecular em função do tempo de maturação das células de <i>S. cerevisiae</i> e dos tratamentos.....	103

RELAÇÃO DE QUADROS

	Página
1. Eficiência dos métodos de ruptura e permeabilização do envelope celular de <i>S. cerevisiae</i> representada pela liberação de proteases no sobrenadante após um pré-tratamento das células à -5°C/24h em tampão fosfato de pH 7,0.	120
2. Análise estatística dos resultados determinando a eficiência dos métodos de ruptura e permeabilização do envelope celular de <i>S. cerevisiae</i> representada pela liberação de proteases no sobrenadante após um pré-tratamento das células à -5°C/24h em tampão fosfato de pH 7,0.....	120
3. Eficiência dos métodos de ruptura e permeabilização do envelope celular de <i>S. cerevisiae</i> representada pela liberação de proteases no sobrenadante após um pré-tratamento das células à 30°C/24h em tampão fosfato de pH 7,0.....	121
4. Análise estatística dos resultados demonstrando a eficiência dos métodos de ruptura e permeabilização do envelope celular de <i>S. cerevisiae</i> representada pela liberação de proteases no sobrenadante após um pré-tratamento das células à 30°C/24h em tampão fosfato de pH 7,0.....	121
5. Influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10 % vol) de pH 3,0 na inibição das proteases de células de <i>S. cerevisiae</i> . O extrato celular foi obtido em tampão hidroalcoólico de pH 3,0.....	122
6. Análise estatística dos resultados demonstrando a influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10 % vol) de pH 3,0 na inibição das proteases de células de <i>S. cerevisiae</i> . O extrato celular foi obtido em tampão hidroalcoólico de pH 3,0.....	122
7. Influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10 % vol) de pH 3,0 na inibição das proteases de células de <i>S. cerevisiae</i> . O extrato celular foi obtido em tampão fosfato de pH 7,0.....	123

8. Análise estatística dos resultados demonstrando a influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10 % vol) de pH 3,0, na inibição das proteases de células de <i>S. cerevisiae</i> . O extrato celular foi obtido em tampão fosfato de pH 7,0.....	123
9. Influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10 % vol) de pH 3,0 na liberação de compostos nitrogenados intracelulares de baixo peso molecular de células de <i>S. cerevisiae</i>	124
10. Análise estatística dos resultados demonstrando a influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10 % vol) de pH 3,0 na liberação de compostos nitrogenados intracelulares de baixo peso molecular de células de <i>S. cerevisiae</i>	124
11. Influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10 % vol) de pH 3,0 na hidrólise de compostos nitrogenados intracelulares de células de <i>S. cerevisiae</i> . O extrato foi obtido em tampão hidroalcoólico de pH 3,0.....	125
12. Análise estatística dos resultados demonstrando a influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10 % vol) de pH 3,0 na hidrólise de compostos nitrogenados intracelulares de células de <i>S. cerevisiae</i> . O extrato foi obtido em tampão hidroalcoólico de pH 3,0.....	125
13. Influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10 % vol) de pH 3,0 na hidrólise de compostos nitrogenados intracelulares de células de <i>S. cerevisiae</i> . O extrato foi obtido em tampão fosfato de pH 7,0.....	126
14. Análise estatística dos resultados demonstrando a influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10 % vol) de pH 3,0 na hidrólise de compostos nitrogenados intracelulares de células de <i>S. cerevisiae</i> . O extrato foi obtido em tampão fosfato de pH 7,0.....	126
15. Evolução da atividade proteásica intracelular em função do tempo (meses) de maturação das células de <i>S. cerevisiae</i> no "vinho espumante".....	127
16. Análise estatística dos resultados demonstrando a evolução da atividade proteásica intracelular em função do tempo (meses) de maturação das células de <i>S. cerevisiae</i> no "vinho espumante".....	127

17. Evolução da concentração de compostos nitrogenados de baixo peso molecular no "vinho espumante" em função do tempo (meses) de maturação das células de <i>S. cerevisiae</i>	128
18. Análise estatística dos resultados demonstrando a evolução da concentração de compostos nitrogenados de baixo peso molecular no "vinho espumante" em função do tempo (meses) de maturação das células de <i>S. cerevisiae</i>	128
19. Evolução da concentração de compostos nitrogenados intracelulares de baixo peso molecular em função do tempo (meses) de maturação das células de <i>S. cerevisiae</i> no "vinho espumante".....	129
20. Análise estatística dos resultados demonstrando a evolução da concentração de compostos nitrogenados intracelulares de baixo peso molecular em função do tempo (meses) de maturação das células de <i>S. cerevisiae</i> no "vinho espumante".....	129
21. Evolução da atividade proteásica no "vinho espumante" em função do tempo (meses) de maturação das células de <i>S. cerevisiae</i> e dos tratamentos....	130
22. Análise estatística dos resultados demonstrando a evolução da atividade proteásica no "vinho espumante" em função do tempo (meses) de maturação das células de <i>S. cerevisiae</i> e dos tratamentos.....	131
23. Evolução da concentração de compostos nitrogenados de baixo peso molecular no "vinho espumante" em função do tempo (meses) de maturação das células de <i>S. cerevisiae</i> e dos tratamentos.....	133
24. Análise estatística dos resultados demonstrando a evolução da concentração de compostos nitrogenados de baixo peso molecular no "vinho espumante" em função do tempo (meses) de maturação das células de <i>S. cerevisiae</i> e dos tratamentos.....	134
25. Evolução da concentração de compostos nitrogenados intracelulares de baixo peso molecular em função do tempo (meses) de maturação das células de <i>S. cerevisiae</i> e dos tratamentos.....	136
26. Análise estatística dos resultados demonstrando a evolução da concentração de compostos nitrogenados intracelulares de baixo peso molecular em função do tempo (meses) de maturação das células de <i>S. cerevisiae</i> e dos tratamentos.....	137

1. INTRODUÇÃO

Em face da intensa competição por mercados, maiores níveis de qualidade esperados pelos consumidores e globalização das economias, as iniciativas visando somente o incremento qualitativo contínuo não são mais suficientes. Necessitamos agregar, ao processo de aprimoramento contínuo, ganhos radicais e exponenciais ao invés de incrementais.

Estas mudanças radicais necessitam novos enfoques agregados ao processo de qualidade como a ruptura do processo ou "breakthrough" (inovação, reengenharia), o qual combina o conceito da visão de processo com a aplicação da inovação em processos chaves. Esta combinação tem o poder de auxiliar as organizações a obterem reduções de custo ou tempo, aprimorar a qualidade dos produtos, flexibilidade, níveis de serviço e outros objetivos do negócio.

A busca de otimização do processo de autólise de células de levedura inserido em um contexto de aprimoramento dos processos enológicos é uma tentativa de realizar um ganho expressivo de tempo do processo e de qualidade do produto final, introduzindo uma inovação nos conceitos e técnicas atualmente empregadas na elaboração de vinhos espumantes de qualidade.

No Brasil, a elaboração de vinhos espumantes através de uma segunda fermentação natural (champanha ou champagne) é realizada quase que exclusivamente na Região da Serra Gaúcha, principalmente, nos municípios de Garibaldi e Bento Gonçalves.

O método predominantemente adotado realiza a segunda fermentação em tanques (método "cuve-close" ou "charmat"¹) com um período médio de maturação sobre as leveduras de 1 a 6 meses, devido, principalmente, a limitada capacidade em tanques isobáricos da segunda fermentação alcoólica disponível a cada indústria vinícola e a busca de minimização dos custos financeiros incidentes sobre o produto estocado. Contudo, essa limitação temporal minimiza as trocas necessárias entre a biomassa de leveduras e o vinho espumante, diminuindo a qualidade do produto final obtido.

Durante o período de maturação, uma série de compostos intracelulares são hidrolizados total ou parcialmente pela ação de enzimas da própria célula de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, fenômeno conhecido como autólise. O enriquecimento do vinho espumante com esses compostos parece ser a base de um ganho qualitativo importante no aspecto organoléptico e na qualidade de espuma.

Embora tanto a identificação dos agentes como a definição das vias bioquímicas envolvidas nesse processo de qualificação não estejam completamente

1/ O método "cuve-close" ou "charmat" refere-se a elaboração de vinhos espumantes em tanques isobáricos de grande capacidade (de 10 000 a 30 000l normalmente).

realizados, considera-se que ocorra um enriquecimento qualitativo e quantitativo do vinho espumante em elementos aromáticos como consequência da autólise das células de leveduras em maturação no vinho espumante.

A liberação desses elementos intracelulares de potencialidade qualitativa depende de vários fatores, mas, principalmente, do período de contato entre a biomassa de leveduras e o vinho espumante, visto que outros fatores que poderiam influenciar de maneira importante a cinética do processo como a temperatura e o pH do produto, normalmente, não são passíveis de modificação.

Alguns grandes vinhos brancos da região de Borgonha (tipo "Meursaut") e os vinhos espumantes elaborados segundo o "méthode champenoise"² na região de Champagne, ambos na França, são conservados em contato com as leveduras por um período mínimo de 8 e 18 meses respectivamente; segundo a legislação específica que rege as práticas enológicas adotadas nessas regiões de denominação de origem controlada³. Atribui-se, historicamente, como um dos principais fatores responsáveis pela reconhecida qualidade desses produtos, a longa permanência do vinho sobre as leveduras.

2/ Diz-se "méthode champenoise" quando o vinho espumante realiza a segunda fermentação alcoólica, a "prise de mousse", em garrafas de vidro e quando se observa um período mínimo de maturação das células de leveduras sob o vinho espumante, definido pela legislação da região produtora.

3/ Denominação de origem controlada ("Appellation D'Origine Contrôlée" - AOC) é uma designação especial aos vinhos elaborados em uma região específica, segundo padrões de qualidade tais que permitam agrupa-los sob uma mesma denominação comum. Como essa distinção é expressa no rótulo, evidentemente é um forte apelo de consumo.

Contudo, em outras regiões produtoras de vinhos espumantes, buscaram-se alternativas tecnológicas que possibilitaram diminuir ou eliminar a necessidade de um longo período de maturação do vinho espumante sobre as leveduras para que este se beneficie das consequências qualitativas do processo de autólise.

É o caso do aquecimento do vinho espumante junto com as células de leveduras e/ou a homogeneização das mesmas no seio do líquido.

Essas práticas tecnológicas difundiram-se, principalmente, nas regiões em que se trabalhavam com o método "charmat" de elaboração de vinhos espumantes, pois nesse caso as facilidades operacionais intrínsecas a esse método facilitaram grandemente a realização das intervenções.

Contudo, se de um lado o tratamento térmico do vinho espumante em presença das leveduras provoca uma liberação imediata dos compostos intracelulares representados, principalmente, pelos compostos nitrogenados de baixo peso molecular, de outro lado a brutal variação de temperatura a que o vinho espumante é submetido traz consequências qualitativas negativas que desautorizam a adoção do processo. Além disso, a eficiência da homogeneização do vinho espumante com as células de leveduras na aceleração do processo de autólise não é comprovada.

Com a adição de extratos de leveduras nos vinhos espumantes objetiva-se não só o enriquecimento imediato do produto com compostos intracelulares como a aceleração do fenômeno de autólise das leveduras já em processo de maturação pela ação enzimática presente no extrato.

Nesse sentido, os fatores envolvidos no processo de obtenção do extrato de leveduras são determinantes na composição enzimática e na riqueza de elementos intracelulares presentes no extrato.

Este trabalho têm como objetivo contribuir na determinação de um processo de obtenção de extratos de leveduras de vinificação, de maneira a aproveitar plenamente as potencialidades que os diversos constituintes intracelulares podem representar para a qualificação dos vinhos espumantes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Variações morfológicas da célula de levedura durante o processo de autólise

O envelope celular das leveduras é fina nas células jovens, espessando-se com a idade. Os principais constituintes da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* são dois polissacarídeos, glucano (30 a 34%) e manano (30%) e proteínas (6 a 8%), parte da qual possuindo atividade enzimática, já que invertases e outras hidrolases foram identificadas na parede celular (PELCZAR et al., 1980).

A parede celular interna é composta de uma mistura de glucanos β (1,3) e β (1,6) interligados, formando uma estrutura similar à celulose (HUNTER & ASENJO, 1987) e que corresponde à 55-60% da parede (HUNTER & ASENJO, 1988). Ela é coberta por uma camada externa de um complexo de mananos-proteínas que consiste de dois tipos de mananos ligados à uma rede de proteínas. Ambas as paredes, interna e externa, devem ser hidrolizadas para liberar os constituintes celulares (HUNTER & ASENJO, 1987).

A superfície externa de mananos-proteínas é interligada por ligações dissulfídicas e intraligada por ligações de hidrogênio e, embora permita a penetração de pequenas moléculas, age como uma barreira para enzimas que possam hidrolizar

a parede interna de glucanos. Esta por sua vez evita a lise osmótica da célula e a ruptura mecânica.

A membrana citoplasmática é de natureza lipoprotéica e, da mesma maneira que a parede celular, é heterogênea, existem duas camadas de proteínas separadas por uma fase lipídica (BABAYAN & BEZRUKOV, 1985).

PITON et al. (1988) observaram modificações ultraestruturais em leveduras durante o processo de maturação no vinho espumante demonstrados por cortes ultrafinos da célula observados em microscópio eletrônico.

Focalizando somente as mudanças ocorridas nos primeiros 6 meses, pode-se enumerar os seguintes eventos:

- a) Transformação da parede celular com o desaparecimento total da camada interna de composição predominante polissacarídica;
- b) Plasmólise das células a partir do terceiro mês;
- c) Acumulação de substâncias de reserva de natureza lipídica neutra em vesículas;
- d) Decréscimo das concentrações de lipídios polares (em torno de 57%), típicos de membranas ativas fisiologicamente.

2.2 Efeitos qualitativos do processo de autólise de leveduras no vinho espumante

2.2.1 Efeito qualitativo da liberação de colóides

Designa-se colóides do vinho um conjunto de macromoléculas que tem como origem a uva (proteínas, polisacarídeos neutros e ácidos) ou as leveduras (glucanos e sobretudo manoproteínas) (LUBBERS et al., 1993).

Os vinhos espumantes da região de Champagne possuem de 150 a 200 mg/l de polissacarídeos (TUSSEAU & VAN LAER, 1993).

FUMI et al. (1987) observaram variações no conteúdo de polisacarídeos da célula de *S. cerevisiae* durante o processo de autólise no vinho espumante: os glucanos diminuíram 12% durante os 8 primeiros meses de maturação e, os mananos e glucanos diminuíram, respectivamente, 17,6% e 18,4% durante os 36 meses de maturação; indicando uma liberação gradual desses compostos no vinho espumante.

FEUILLAT et al. (1988) sugeriram que há uma forte tendência de liberação de colóides (glicoproteínas oriundas da parede celular) das células de leveduras nos primeiros oito meses de conservação em vinhos espumantes, independente das cepas utilizadas, com um aumento da concentração desses elementos de 200 mg/l para mais de 500 mg/l no período.

LLAUBÈRES et al. (1987) definiram que as manoproteínas são os principais componentes das glicoproteínas exocelulares liberadas durante a

fermentação alcoólica e durante a manutenção das leveduras no vinho por vários meses; os autores complementaram que o grau de liberação dessas substâncias depende da cepa de levedura, da temperatura de fermentação e da duração da estocagem do vinho em contato com as células.

USSEGLIO-TOMASSET (1976) determinou que a composição aproximada dos polissacarídeos liberados pela levedura no meio de fermentação era de 80% manose e 20% glicose, valores confirmados por LLAUBÈRES et al. (1987). FEUILLAT et al. (1988) citaram que as glicoproteínas liberadas durante a maturação por 8 meses de células de leveduras em um vinho espumante possuem 75 a 80% de açúcares e 3 a 4% de nitrogênio.

A interação entre as macromoléculas coloidais liberadas durante o processo de autólise e os compostos voláteis presentes nos vinhos espumantes foi demonstrada em uma solução hidroalcoólica por alguns autores (MURY & BEGUIN apud FEUILLAT et al., 1988, p.44), seja no plano sensorial, seja por análise instrumental, através da modificação da intensidade de percepção e do coeficiente de volatilidade dos compostos aromáticos de acordo com a presença ou não de colóides.

Mais recentemente, LUBBERS et al. (1993), evidenciaram a relação entre a fração protéica dos colóides oriundos da levedura e a volatilidade de várias moléculas aromáticas importantes no aroma dos vinhos, principalmente a β -ionona (aroma floral, violeta) e o hexanoato de etil (aroma frutado) que são fixados de maneira preponderante. A β -ionona é fixada em uma taxa de 17% e o hexanoato de etil a uma taxa de 3% (μ moles de aroma fixado/100 μ moles de aroma).

Degustações realizadas no Instituto de Enologia de Bordeaux, de vinhos que tiveram um aumento do conteúdo de polissacarídeos solúveis demonstraram um efeito positivo na percepção de redondeza e amplitude do sabor do vinho segundo LLAUBÈRES et al. (1987).

Complementarmente, as glicoproteínas de origem parietal da levedura possuem um poder tensoativo que é um fator positivo na qualidade da espuma nos vinhos espumantes com a melhoria da fineza e da persistência, como foi demonstrado por BIDAN & SALGUES apud FEUILLAT et al. (1988, p.44).

Além disso, LEDOUX et al. (1992), caracterizaram a ação estabilizadora das glicoproteínas macromoleculares frente as precipitações proteicas nos vinhos devido a sua ação protetora coloidal que impede a condensação das últimas.

2.2.2. Efeito qualitativo da liberação de ácidos graxos

Em estudos conduzidos sobre a cerveja, CHEN et al. apud SILVA et al. (1987, p.141) demonstraram que durante o contato da cerveja com uma quantidade relativamente importante de leveduras, ocorria a liberação de ácidos graxos essencialmente em C8 e C10.

Segundo FERRARI et al. (1987), o teor de lipídios diminui no vinho espumante durante a segunda fermentação (de 2,4 para 2,0 $\mu\text{mol/l}$) e aumenta gradativamente durante os primeiros seis meses de conservação sobre as leveduras (atingindo 2,4 $\mu\text{mol/l}$) dobrando até o final do primeiro ano (4,0 $\mu\text{mol/l}$). Ao final do

segundo ano de maturação o vinho espumante apresenta valores bem mais baixos ($1,4\mu\text{mol/l}$).

FERRARI & FEUILLAT (1988) observaram que a maturação dos vinhos brancos em contato com as leveduras, na região de Bourgogne, provoca um ligeiro enriquecimento de ácidos graxos. Em relação à análise sensorial de vinhos maturados ou não sobre as leveduras, prefere-se os vinhos que foram separados da biomassa logo após o término da fermentação; contudo, esses resultados abrangeram somente um período de envelhecimento em garrafas de 2 anos, enquanto que essa categoria de vinhos normalmente apresenta a sua plenitude organoléptica em um período que pode ir até 10 anos.

2.2.3 Efeito qualitativo da formação de gases derivados do enxofre

A autólise de leveduras pode levar a formação de gases derivados de enxofre segundo RANKINE apud ESCHENBRUCH et al. (1978, p.72).

Em estritas faixas de concentração, o gás dimetilsulfito pode contribuir positivamente para o aroma de vinhos (du PLESSIS et al. apud MORA et al., 1986, p.27).

MORA et al. (1986) determinou que a cisteína pode ser um importante precursor na formação de dimetil sulfito. Nesse caso, a permanência de um vinho espumante sobre as leveduras pode ser um fator importante na formação desse composto.

2.2.4 Efeito qualitativo da liberação de compostos nitrogenados de baixo peso molecular

A autólise de leveduras foi definida por BABAYAN & BEZRUKOV (1985) como a hidrólise enzimática de biopolímeros intracelulares, consecutiva à morte da célula, traduzindo-se pela liberação no meio de compostos de baixo peso molecular.

Levando-se em consideração a abundância proteica na célula de levedura e sabendo-se que 75% desse potencial é hidrolisável pelas proteases intracelulares (CORDONNIER apud BIDAN et al., 1985, p.27), entende-se porque a liberação no vinho de compostos nitrogenados de pequeno peso molecular (peptídeos e sobretudo aminoácidos) são frequentemente citados como indicadores do fenômeno de autólise.

Contudo, em alguns casos com mais de um ano de conservação sobre leveduras, certos aminoácidos no vinho espumante tem tendência a diminuir (BIDAN et al., 1985). Essa última observação está provavelmente relacionada com a desaminação dos aminoácidos provocando uma liberação de nitrogênio amoniacal como foi notado em champagnes envelhecidos por PERIN & LLORCA (1974).

Estudando o efeito de método de propagação do fermento (em vinho ou mosto diluído) no processo autolítico, LEROY et al. (1990) exemplificou a evolução dos compostos nitrogenados no vinho espumante (Figura 1).

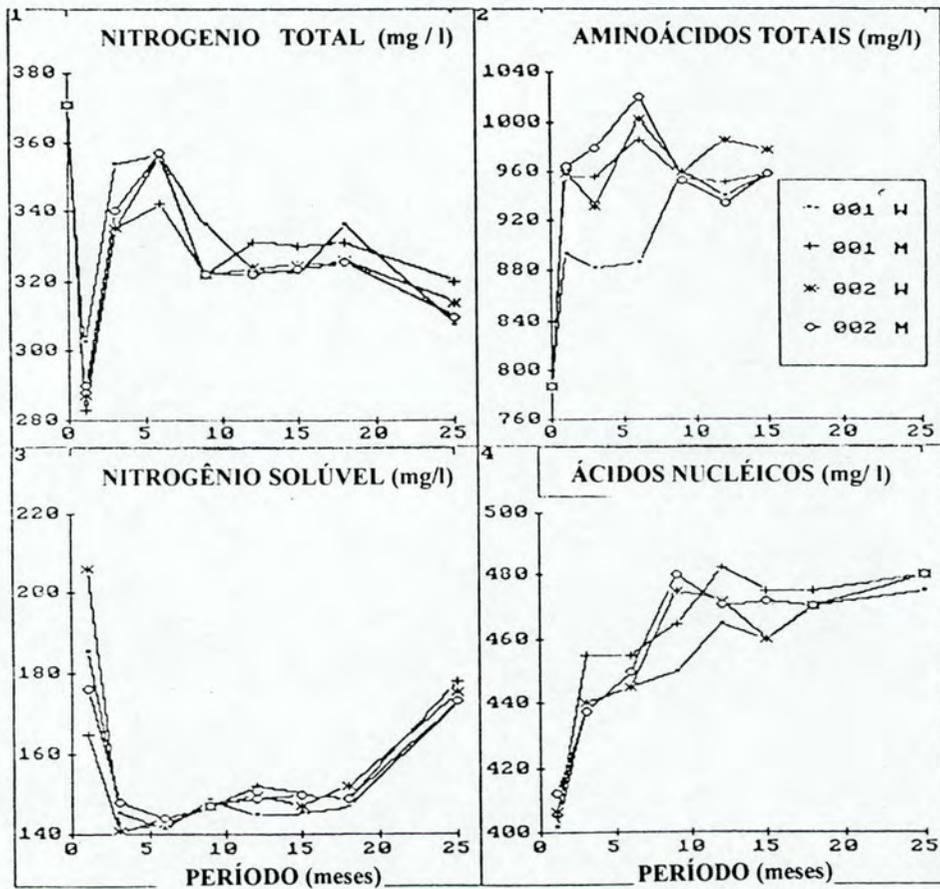


FIGURA 1. Evolução dos compostos nitrogenados no vinho espumante, nos ensaios com a cepa 001 propagada no vinho (001W) e no mosto diluído (001M), e a cepa 002 propagada no vinho (002W) e no mosto diluído (002M).
 Fonte: LEROY et al., (1990, p. 23).

É interessante notar o aumento importante da maioria dos fatores nos primeiros três meses de maturação, o que, segundo os autores, é devido, em grande parte, a fase de liberação passiva dos compostos nitrogenados do interior da célula para o vinho. Por outro lado, os autores assinalaram o aumento importante do nitrogênio solúvel entre o décimo oitavo e o vigésimo quinto mês como uma consequência do aumento da atividade proteásica nas leveduras.

Segundo LURTON (1989), a repartição do nitrogênio total liberado pelas leveduras, durante um período de maturação de um ano, estabeleceu-se da seguinte maneira :

Aminoácidos	23%
Pequenos peptídeos (< 1000 D)	22%
Peptídeos (1000 a 10000 D)	33%
Macromoléculas (> 10000 D)	16%

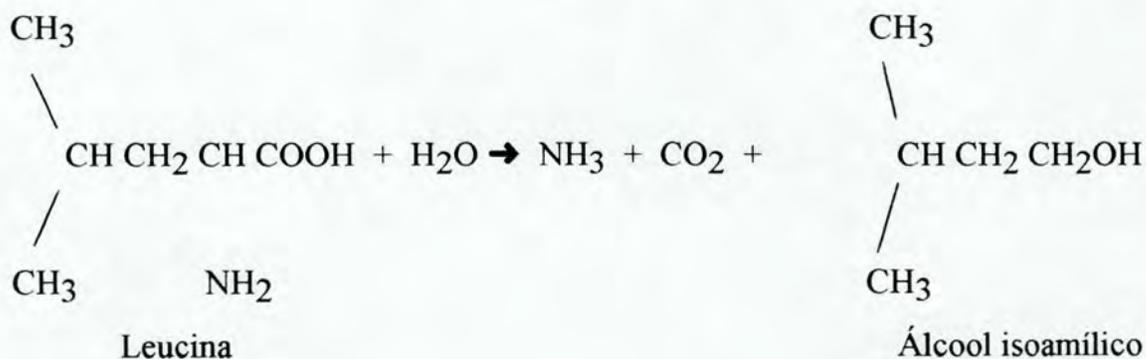
Os principais aminoácidos determinados em 33 vinhos espumantes comerciais foram a prolina, a arginina, a treonina e a alanina segundo COLAGRANDE et al. (1984).

Em relação a sua contribuição no gosto dos vinhos espumantes, pode-se supor que um certo amargor possa ser proveniente de alguns aminoácidos livres ou dipeptídios que apresentam tal característica em solução aquosa como é o caso da valina, leucina, fenilalanina, tirosina, isoleucina e triptofano (FARFÁN, 1990). Contudo, esses aminoácidos não existem em concentrações importantes (relativas aos outros aminoácidos) nos vinhos espumantes como observou COLAGRANDE et

al. (1984) e podem diminuir durante o processo de maturação sobre leveduras, com excessão da isoleucina e do triptofano, como determinou SILVA et al. (1987).

Uma outra possibilidade de influência qualitativa originada do processo de autólise das células de leveduras, durante o processo de maturação dos vinhos espumantes, é a formação de álcoois superiores.

Apesar dos álcoois superiores serem considerados fatores negativos na qualidade de aroma dos vinhos, eles são componentes essenciais no aroma secundário e podem ter uma influência positiva na qualidade, principalmente, quando o número de carbonos presente na molécula é superior a dez (NAVARRE, 1988). Segundo o mesmo autor, esses compostos são formados pela desaminação de um aminoácido a partir do metabolismo nitrogenado das leveduras como segue:



Como essa reação se produz ao mesmo tempo que uma decarboxilação, à um ácido C_n corresponde um álcool superior C_{n-1}.

Porém, AVAKYANTZ & SCHAKAROVA apud BIDAN et al. (1985, p.31) afirmaram que as leveduras em autólise não cedem ao meio alcóois superiores

como o isobutílico ou o álcool isoamílico, o que é favorável para a qualidade do produto, pois a presença desses alcóois em grande quantidade comunicam aromas similares à querosene.

Contudo, BEVERS & VERACHTERT (1976) observaram que células de *Saccharomyces cerevisiae* na fase estacionária formam apenas traços de álcoois superiores a partir de glicose. Contudo, quando aminoácidos ou outros precursores foram adicionados ao meio de fermentação houve a formação de álcoois superiores, em especial n-propanol.

Da mesma maneira, CHAMBERLAIN (1989) relatou que a adição de aminoácidos ao meio de fermentação de uma cultura contínua de *Saccharomyces cerevisiae* provocou o aumento na formação de álcoois superiores, mas pouco influenciou a formação de ésteres.

Como uma percentagem das células de leveduras se mantém viáveis por até três meses após o final da segunda fermentação alcoólica (SILVA et al., 1987), é possível que através do metabolismo nitrogenado dessas células, se formem álcoois superiores, visto que as células que já perderam sua viabilidade e se encontram em processo de autólise liberam aminoácidos no vinho espumante.

Nesse sentido, ZAMBONELLI et al. (1991) demonstraram uma estreita relação entre uma alta produção de isobutanol e a capacidade autolítica de diferentes cepas de *S. cerevisiae*.

2.2.5 Efeito qualitativo da formação de ésteres e terpenos

Os "ésteres químicos", aqueles formados após a fermentação alcoólica por reações enzimáticas entre os ácidos orgânicos e os álcoois, contribuem na formação do aroma terciário dos vinhos, revelando-se por aromas de manteiga e de nozes (NAVARRE, 1988).

Alguns autores, (USSEGLIO-TOMASSET et al., 1983), (COLAGRANDE et al. 1984), (MARGUERI et al., 1984), consideraram que as características organolépticas típicas dos vinhos espumantes maturados na presença de leveduras são devidas à evolução química dos compostos do aroma, sem a intervenção de atividades enzimáticas celulares.

Contudo, vários trabalhos caracterizaram o período de maturação do vinho espumante sobre as leveduras como uma importante fase de formação de ésteres e terpenos, que contribuem qualitativamente para a formação do complexo aroma, o que parece indicar que ésteres sintetases oriundas das células de leveduras poderiam estar envolvidas.

AVAKYANTZ & SCHAKAROVA apud BIDAN et al. (1985, p.31) demonstraram que, a partir de um meio sintético de composição similar ao vinho, a conservação de leveduras nesse meio, seja a 20°C durante um mês ou a 45 - 60°C durante dois dias, provoca a formação de dezenas de compostos entre os quais se encontram, principalmente, os ésteres de alto ponto de ebulição dos alcóois etílico, isobutílico, isoamílico, terpênico e ácidos graxos: capróico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico e palmítico.

Em um trabalho sobre a composição dos aromas dos vinhos espumantes RODOPULO et al. apud BIDAN et al. (1985, p.31) precisaram que são os ésteres de alto ponto de ebulição que conferem a melhor qualidade aromática, citando em particular o isoamilcaproato, o linolilacelato e o geranilacetato.

Em experimentos conduzidos sobre vinhos espumantes e também sobre um tampão hidroalcoólico de composição semelhante ao vinho, MOLNAR et al. (1981) sugeriram como uma consequência direta da autólise de leveduras a liberação de vários ésteres e terpenos, incluindo etil caproato, β -ionona, etil miristato e etil palmitato; o processo era quantitativamente dependente da temperatura mantida.

SILVA et al. (1987) relacionaram a presença de leveduras no vinho espumante em maturação com a aceleração das reações de esterificação e de hidrólise com conseqüente aumento das concentrações de ésteres, em particular o succinato de dietila.

Uma lactona com um anel aromático, com aroma de noz verde, foi caracterizada como um dos componentes do aroma de espumantes envelhecidos sobre as leveduras durante 1-4 anos por FEUILLAT apud KELLY-TREADWELL (1988, p.64).

2.3. Fatores do processo de autólise de leveduras nos vinhos espumantes

2.3.1. Influência da temperatura

Mudanças na temperatura afetam as reações enzimáticas de várias maneiras. Essas incluem efeitos na estabilidade das enzimas, mudanças na solubilidade dos gases, pH do tampão, afinidade da enzima em relação a ativadores e inibidores, reações de competição, ionização de grupos prototrópicos do sistema, afinidade enzima-substrato, velocidade de quebra do complexo enzima-substrato e grau de associação de enzimas multipolipeptídicas (WHITAKER, 1972). É normal, então, que a temperatura na qual um sistema enzimático esteja inserido seja determinante na eficiência do processo.

Contudo, deve-se diferenciar a influência da temperatura em dois aspectos diferentes e independentes de regulação do fenômeno de autólise. O primeiro e mais imediato efeito das condições de temperatura, mais especificamente da variação apreciável de temperatura, parece influenciar a taxa de autólise de maneira determinante através de modificações induzidas da membrana celular (BABAYAN & BEZRUKOV, 1985) que facilitam a liberação de compostos intracelulares no meio.

O segundo aspecto, o efeito da temperatura na atuação das enzimas intracelulares envolvidas no processo de hidrólise das endoestruturas, está diretamente ligado com o período do tratamento e é dependente de vários outros fatores como citado acima.

Segundo SUGIMOTO (1974), temperaturas acima de 35° a 40°C durante 15 dias iniciaram o processo de autólise das leveduras .

BÉHALOVÁ & BERAN (1979) consideraram a faixa de temperatura de 45-50°C como ótima para favorecer o processo de autólise de leveduras tomando-se um período de tempo de 2-3 horas.

COLAGRANDE & SILVA (1981a) descreveram um tratamento térmico (40°C / 72h) em fase industrial dos vinhos espumantes em contato com as leveduras elaborados na Itália em método de "cuve-close" (95% da produção total), para obter características organolépticas particulares no produto final.

Essa técnica é fundada na hipótese segundo a qual um aquecimento breve (24-72 horas) e moderado (35°C - 45°C) do vinho espumante em contato com as leveduras após a segunda fermentação provoca a excreção de certas substâncias contidas nas leveduras como os aminoácidos e os ácidos nucléicos, em especial, o ácido glutâmico, a lisina e a arginina, provocando um aumento de 4-12% no teor de compostos nitrogenados de peso molecular inferior a 1000 (COLAGRANDE & SILVA, 1981a). Paralelamente, ocorre uma diminuição de 6-9% nos teores de compostos nitrogenados de peso molecular mais elevado(peptídios e proteínas) (COLAGRANDE & SILVA, 1981b), (COLAGRANDE et al., 1984).

MOLNAR et al. (1980a) determinaram que na faixa de 4° a 40°C de temperatura o processo de autólise aumenta linearmente com um aumento de 10°C, correspondendo a um acréscimo de 6-7% na taxa de autólise.

RYAN & WARD (1985) afirmaram que a plasmólise completa da célula de levedura é obtida elevando-se a temperatura à 55-60°C durante 40-48 horas em um meio de pH 5,5.

Por outro lado, um outro aspecto da influência do aquecimento sobre a composição do vinho espumante é o remanejamento dos colóides. Assim, aquecendo-se a 50°C / 72h um vinho espumante no final da segunda fermentação, constatou-se uma diminuição dos colóides de alto peso molecular que são de natureza glicoprotéica (FEUILLAT & GIZZI apud BIDAN et al., 1985, p.31).

FEUILLAT & CHARPENTIER (1982) demonstraram que em uma solução tampão de pH 5, a liberação de nitrogênio a partir de células de leveduras incubadas é mais rápida nas faixas de temperatura superiores (55°C e 44°C em relação à 36°C). Mas após aquecer a 55°C durante 4 horas, a concentração de aminoácidos não aumenta. Aquecendo a temperaturas mais baixas a autólise continua por 48 horas ou até mais, e as concentrações de nitrogênio liberado a 36°C são tão altas quanto aquelas liberadas a 44°C.

Esse tipo de cinética sugere que, em primeiro lugar, ocorre uma liberação passiva de compostos nitrogenados das células para o meio que é seguida de uma ação enzimática, a qual é rapidamente inibida a altas temperaturas (BIDAN et al., 1985).

Segundo NEKLYUDOV et al. (1993), a atividade proteolítica de autolisados de leveduras residuais de cervejaria diminui proporcionalmente ao

aumento da temperatura de 37 a 65°C e ao aumento do período de tratamento de 0 a 20 horas.

Se as leveduras são aquecidas a 45°C durante quatro dias antes de recolocá-las em incubação a 37°C num tampão pH 5, constatou-se, segundo FEUILLAT & CHARPENTIER (1982), que não há mais liberação de nitrogênio. Isso parece indicar que uma parte das reservas celulares de aminoácidos teria se esvaziado e que, por outro lado, as leveduras não poderiam mais ser o local de autólise, pois as enzimas intracelulares responsáveis por esse fenômeno teriam sido destruídas.

Nesse sentido, FEUILLAT (1986) observou que, segundo o tratamento térmico, pode-se obter autolisados de leveduras com características diferentes: a incubação da biomassa a 30°C durante 48 horas permite a obtenção de um autolisado menos rico em nitrogênio, mas com células que possuem uma forte atividade proteásica intracelular e conservam então, uma forte capacidade autolítica residual; porém, com a incubação da biomassa a 50°C, durante o mesmo período, obtém-se um autolisado com um sobrenadante mais rico em compostos nitrogenados, mas as células não possuem nenhuma atividade enzimática (Tabela 1).

TABELA 1. Propriedades de autolisados de leveduras obtidos segundo diferentes temperaturas de tratamento.

	N Total do sobrenadante ($\mu\text{g N/ml}$)	Atividade proteásica intracelular ($\mu\text{g N/ml/6h}$)	Capacidade autolítica residual ($\mu\text{g N/ml}$)*
Leveduras antes da autólise	-	1569	1116
Leveduras autolisadas a $30^{\circ}\text{C}/48\text{ h.}$	473	1842	678
Leveduras autolisadas a $50^{\circ}\text{C}/48\text{ h.}$	930	0	15

* Quantidade de N liberado pelas leveduras durante uma segunda incubação de 48 horas a 30°C em tampão hidroalcoólico pH 3.

Fonte: FEUILLAT (1986, p. 6).

Contudo, MOLNAR et al. (1980b) observaram que a manutenção prolongada (além de 40 dias) de células de leveduras em um vinho espumante a 30°C parece inativar as proteases intracelulares.

Conclusão semelhante obteve LURTON (1989). Ele demonstrou que a temperatura de 15°C favorece mais a ação das proteases considerando-se períodos longos de tempo (1 mês ou mais), do que a temperatura de 30°C .

Porém, quando se determinou a liberação de compostos nitrogenados intracelulares das leveduras em períodos menores de tempo, por exemplo 10 dias

como fez SUZZI (1990) com 10 cepas diferentes de *S. cerevisiae*, a faixa de temperatura mais efetiva situou-se em torno de 35°C. Nesse período, a liberação desses compostos a 15°C foi irrelevante.

Paralelamente, se considerarmos a liberação de outros componentes intracelulares da célula de levedura como os polissacarídeos, na temperatura de 35°C é muito superior (mais de 100%) do que na de 22°C, considerando-se um período de 30 dias como demonstraram LLAUBÈRES et al. (1987).

Embora não haja referência à informação da influência da temperatura sobre as glucanases de *S. cerevisiae*, KITAMURA (1982), trabalhando com uma β -1,3-glucanase purificada de *Arthrobacter luteus*, definiu que sua ótima temperatura era de 45°C.

2.3.2 Influência do pH

Uma determinada enzima possui um máximo de atividade dentro de uma estreita faixa de pH. Contudo, o ótimo pH de uma enzima é dependente de vários parâmetros experimentais, incluindo o tempo de reação, temperatura, natureza e concentração do substrato, natureza e concentração do tampão, força iônica e constante dielétrica do meio (modulada pela adição de solventes orgânicos como o etanol) e efeito do pH na estabilidade de cofatores e ativadores (WHITAKER, 1972).

O pH ótimo de autólise das leveduras é da ordem de 5 (VOSTI & JOSLYN, 1954), (BÉHALOVÁ & BERAN, 1979).

Nesse sentido, KITAMURA (1982) trabalhando com uma β -1,3-glucanase purificada de *Arthrobacter luteus*, definiu que seu ótimo pH era de 5,0.

Contudo, em um pH vizinho daquele do vinho, ou seja, da ordem de 3 a 3,5, as quantidades de compostos nitrogenados liberados por leveduras incubadas a 30-35°C são importantes seja num meio tampão (pH 3 ou pH 5), seja no próprio vinho (FEUILLAT & CHARPENTIER, 1982).

LURTON (1989) confirma o pH 5 como sendo o mais favorável para o processo de autólise: a incubação das células de leveduras em pH 5 durante 7 dias em uma temperatura de 40°C levou ao máximo de liberação de compostos nitrogenados de origem enzimática (85% do nitrogênio celular); em pH 3,0 somente 65% do conteúdo nitrogenado da célula foi liberado nas mesmas condições.

Porém, segundo BABAYAN & BEZRUKOV (1985), na faixa de pH 5-6, a liberação de lipídios é limitada, pois esses elementos se agregam formando uma gota que não é liberada no meio durante o processo de autólise.

2.3.3 Influência do teor alcóolico

O etanol é utilizado como um agente permeabilizador do envelope de células de leveduras em conjunto com a ação de plasmólise do cloreto de sódio (2-5%) em processos industriais de obtenção de extratos. SUGIMOTO et al. (1972) observaram que, na concentração de 1 a 9 %vol, o etanol aumenta gradativamente o rendimento do processo, medido em porcentagem de nitrogênio total que varia de 27,2 a 82,4 %.

FENTON (1982) determinou que o tratamento de células de *Kluyveromyces fragilis* com etanol em uma concentração de 80% (peso de solvente/peso seco de células) durante 2-120 minutos, foi tão eficiente quanto o uso de metanol, isopropanol e butanol e mais eficiente do que tolueno na liberação de β -galactosidase. O autor complementa que não houve ruptura da parede celular e que a extração de lipídios parece estar envolvida no processo permeabilizador.

CHARPENTIER et al. (1986) demonstraram indiretamente que ocorre uma autólise mais intensa (liberação de nitrogênio intracelular) em um meio com 13% do que em um meio com 6 %vol de etanol, sem que ocorra diferença entre os dois tratamentos sobre a atividade enzimática de células de *S. cerevisiae*.

Contudo, SUGIMOTO (1974) considerou que a ação enzimática da protease A é consideravelmente inibida em soluções com concentrações alcóolicas superiores a 5 % vol. Porém, o mesmo autor observou que a ação inibitória do etanol é dependente do pH da solução.

O grau alcóolico do vinho (em torno de 11%vol) não é considerado um fator inibidor da autólise por vários autores (BIDAN et al., 1985), (MODRA & WILLIAMS, 1988).

2.3.4 Influência de fatores fisiológicos

SATO et al. (1987) demonstraram que após a perda da capacidade de crescimento em *Saccharomyces cerevisiae* ocorre a promoção das atividades proteásicas na célula com posterior hidrólise dos compostos nitrogenados e excreção

desses no meio. O autor complementou que esse mecanismo de autodestruição após a extinção das células é pré-programado.

Contudo, segundo SLAUGHTER & NOMURA (1992a) a atividade enzimática das proteases A, B e carboxipeptidase Y diminui durante a fase pós-fermentativa de declínio, se for considerada a atividade enzimática em relação à concentração de células e não a atividade enzimática em relação ao peso de proteína da célula. No segundo caso, segundo os autores, o aumento da atividade enzimática decorre mais em função de uma queda do conteúdo proteico das células do que um real aumento da atividade proteolítica.

Os níveis de atividade de todas as proteases vacuolares, exceto a carboxipeptidase S, aumenta quando as células atingem a fase estacionária (SAHEKI & HOLZER, 1975), (FREY & RÖHM, 1979), (JONES, 1991). Esse aumento na atividade enzimática parece estar relacionado com a anulação da repressão causada pela glicose às enzimas (SAHEKI & HOLZER, 1975).

HANSEN et al. (1977) observou que, em *Saccharomyces cerevisiae*, a atividade específica das proteases A e B, carboxipeptidase Y e seus respectivos inibidores IA, IB, IC (citosólicos) é 70-90% maior em um meio sem glicose (ou açúcares fermentativos). Contendo acetato como fonte de carbono, da mesma maneira, a atividade de duas aminopeptidases é 50-70% superior nas mesmas condições. O mesmo autor explica que as proteases não são inativadas após a adição de glicose, mas parecem ser reprimidas. Segundo os autores, o aumento de atividade das proteases, após a exaustão da glicose, sugere que elas possam estar envolvidas na degradação de enzimas que se tornaram supérfluas, promovendo a

disponibilidade de aminoácidos para a síntese de enzimas e permeases necessárias ao crescimento em meio com outras fontes de carbono como acetato ou etanol.

Contudo, FREY & RÖHM (1979) demonstraram que ocorre uma inativação da aminopeptidase I pela adição de glicose ao meio de cultura com células na fase estacionária e não, uma repressão de sua síntese.

A "inativação catabólica" foi definida por HOLZER (1976) como a inativação de enzimas ("galactozimase", α -glucosídeo permease, malato desidrogenase citoplasmático, frutose-1,6-bifosfato, fosfoenolpiruvato carboxiquinase e isopropilmalato sintase) induzida pela glicose ou açúcares metabolicamente comparáveis. Ocorre uma transformação na estrutura conformacional dessas enzimas de tal maneira que elas tornam-se vulneráveis à ação de proteases nos vacúolos (NEEFF et al., 1978). Essa prerrogativa é suportada por estudos bioquímicos que demonstraram que as enzimas inativadas *in vivo* também o são *in vitro* pela protease A ou B (ACHSTETTER & WOLF, 1985). O fenômeno explica-se pelo fato que todas as enzimas glicose-reprimidas são capazes de converter seus substratos em metabólitos que a célula também pode obter, independentemente e mais facilmente, pelo metabolismo da glicose (MAGASANIK apud HOLZER, 1976, p.178); o que explica o interesse desse processo para a economia celular.

Contudo, o isolamento de mutantes desprovidos das enzimas vacuolares proteases A, B e carboxipeptidase Y tornou possível determinar que nenhuma dessas peptidases estavam envolvidas na inativação das enzimas citadas (WOLF et al. apud ACHSTETTER & WOLF, 1985, p.145).

O crescimento das leveduras em meios pobres de nitrogênio resultou no aumento de 2-3 vezes nos níveis da maioria das proteases e peptidases (HANSEN et al., 1977) com ou sem a indução da esporulação (JONES, 1991).

HOUGH & MADDIX (1970) sugeriram que a ação enzimática contida nas vesículas das células de leveduras está relacionada com o início do processo de brotação: a ação proteásica localizada enfraqueceria a parede celular no ponto de brotação.

BETZ (1979) especificou uma estreita relação entre os níveis da protease A e a capacidade de esporular em *Saccharomyces cerevisiae*, demonstrando que um mutante com baixa atividade dessa enzima perde a habilidade de esporular. Da mesma maneira, diversos autores determinaram que a maior função das proteases vacuolares reside na diferenciação do processo de esporulação, que é ativado pela carência de nitrogênio no meio, citados por ACHSTETTER & WOLF (1985). Nesse caso, as proteases vacuolares providenciam aminoácidos em detrimento de proteínas celulares desnecessárias (vegetativas) para a nova síntese protéica para os esporos a serem formados (ACHSTETTER & WOLF, 1985) ao mesmo tempo em que ativam a enzima quitina sintetase (BECK et al., 1980).

Porém, segundo BABAYAN & BEZRUKOV (1985) alguns aminoácidos são inibidores da autólise, cujo efeito é dependente de sua hidrofobicidade.

Da mesma forma, segundo NEKLYUDOV et al. (1994), um conteúdo maior de aminoácidos dicarboxílicos ou de peptídios de baixo peso molecular no autolisado inibe, significativamente a autólise das células de leveduras. Então, com

uma concentração de 0,1M de ácido aspártico, o nível de hidrólise das proteínas intracelulares da levedura foi de apenas 26% e, com uma concentração de 0,1M de ácido glutâmico, 34%, sendo que sem a inibição causada por esses elementos o processo autolítico têm um nível de conversão de 66%. A atividade de enzimas proteolíticas também é afetada por aminoácidos como metionina, lisina e treonina. Quando eles foram introduzidos na massa de células, sendo autolisada numa concentração 0,1M, o nível de hidrólise da proteína celular caiu para 43, 47, e 53%, respectivamente. Contudo, considerando as quantidades de aminoácidos livres que são formados no processo de autólise e sua possível ação inibitória, os autores chegaram à conclusão que sua contribuição para a inativação das enzimas da levedura não é superior à 40%.

2.4 Características das atividades enzimáticas no processo de autólise

2.4.1 Proteases envolvidas e sua importância relativa

LENNEY & DALBEC (1967) caracterizaram duas peptidases na célula de levedura *S. cerevisiae*. Essas proteases designadas como A e B têm respectivamente pH ótimo de atividade de 3,7 e de 6,2 e são capazes de hidrolisar os constituintes proteicos do citoplasma.

DOI et al. (1967) determinaram o pH de 6 e 7 como o de maior estabilidade da protease C nas temperaturas de 50 e 37°C respectivamente.

HOUGH & MADDOX (1970) estabeleceram a temperatura e o pH ideal para as quatro enzimas proteásicas envolvidas no processo de autólise em *S. cerevisiae* sem, contudo, especificar a importância relativa de cada uma delas.

TABELA 2. Características de quatro enzimas proteolíticas liberadas durante a autólise de leveduras.

Enzima	Ótima temperatura de atividade (°C)	Máxima temperatura para estabilidade de 100% (°C)	Ótimo pH para atividade
A	35	0	7,5
B	50	55	6,2
C	50	55	6,2
D	60	65	3,5

Fonte: HOUGH & MADDOX (1970), p. 51.

SUGIMOTO (1974) determinou um pH ótimo de 3,0 para a protease A, 9,0 para protease B e 5,5 para carboxipeptidase Y (ou protease C).

HAYASHI (1976) observou que o a carboxipeptidase Y possui um máximo de atividade em pH 5-6.

O pH 5,0 proporcionou a maior atividade da protease B e carboxipeptidase Y após 18 horas de incubação à 25°C como demonstraram SLAUGHTER & NOMURA (1992b).

Atualmente, o número de proteases conhecidas de *S. cerevisiae* supera

TABELA 3. Proteases da levedura *S. cerevisiae*.

Enzima:	Características	Peso molecular:	Ótimo pH:
Protease A:	endopeptidase carboxílica	42 000	Hemoglobina desnaturada: 3 Caseína: 6
Protease B:	serina sulfidril endopeptidase	33 000	7
Carboxipeptidase Y:	serina exopeptidase	61 000	6

Fonte: ACHSTETTER & WOLF (1985, p. 148), modificada.

As proteases da célula de levedura são localizadas, principalmente, em vacúolos junto com outras enzimas hidrolíticas (ACHSTETTER & WOLF, 1985), em que sua atividade é muito superior do que no citosol da célula (LENNEY apud KELLY-TREADWELL, 1988, p.60), onde os polipeptídios inibidores específicos das proteases A, B e carboxipeptidase Y estão localizados (JONES, 1991), (ACHSTETTER & WOLF, 1985).

As proteases vacuolares estão envolvidas em uma hidrólise de proteínas e peptídios altamente inespecífica e as proteases A, B e a carboxipeptidase Y são as principais enzimas dessa categoria na célula de *S. cerevisiae*, como demonstraram ACHSTETTER et al. apud ACHSTETTER & WOLF (1985, p.146), quando determinaram que a capacidade, de uma cepa mutante desprovida dessas enzimas, em degradar um substrato inespecífico com a metil-caseína foi reduzida em 99%.

A ruptura das células de leveduras provoca a inativação das proteases A, B e carboxipeptidase Y pela complexação com seus inibidores específicos (SAHEKI

et al., 1974), (SAHEKI & HOLZER, 1975), (JONES, 1991); o que leva a supor que os inibidores das proteases estejam envolvidos na regulação dos eventos proteolíticos (BECK et al., 1980).

Nesse sentido, os estudos de BECK et al. (1980) indicaram que a protease A e seu inibidor são sintetizados e regulados independentemente.

Contudo, a incubação dos extratos celulares em baixo pH (4-5) ativa as proteases, aparentemente, pela hidrólise dos inibidores específicos (LENNEY & DALBEC, 1967), (SAHEKI et al., 1974), (SAHEKI & HOLZER, 1975), (JONES, 1991) que é desencadeada por uma pequena quantidade de atividade "livre" da protease A (SAHEKI et al., 1974), (SAHEKI & HOLZER, 1975), (BETZ et al., 1974).

Como observaram SAHEKI et al. (1974) , em pH 3, não ocorre a completa inibição da protease A (mesmo em alta relação inibidores/protease A), isto já não permite supor que nessas condições o efeito inter-ativador das proteases têm início; o que não ocorre a pH 5 ou 7, onde uma maior concentração dos inibidores provoca uma completa inativação da protease A.

Porém, BECK et al. (1980) observaram que, em células mutantes, a atividade do inibidor é reduzida após crescimento em condições limites de temperatura e pH, situação que seria consequência de uma alteração da regulação ou degradação do inibidor e não de uma inativação do próprio.

MAIER & HOLZER apud KELLY-TREADWELL (1988, p.30) ilustraram a ação ativadora interdependente das proteases intracelulares através da inativação das mesmas frente aos inibidores específicos existentes no citosol :

TABELA 4. Inibidores macromoleculares das proteases na levedura.

Inibidor de :	hidrolisados por :	Estabilidade ao calor e à acidez:
Proteinase A IA2 IA3	Proteinase B	Resistentes
Proteinase B IB1 IB2 IB3	Proteinase A	Resistentes
Carboxipeptidase Y IC	Proteinase A e B	Sensíveis

Fonte: MAIER & HOLZER apud KELLY-TREADWELL (1988, p. 30).

Esse mecanismo interdependente de ativação das proteases induz a pensar em um efeito dominó, conforme a concentração relativa de cada protease no meio, sendo que em um meio de baixo pH a ação da protease A é fundamental na ativação das outras enzimas, visto que protease A é a única protease plenamente atuante nesse pH.

HOUGH & MADDOX (1970) já tinham observado a interdependência entre a protease A, a mais abundante, e outras enzimas, pois os produtos dessas

últimas eram, principalmente, peptídeos de peso molecular superior a 5.000 D e, provavelmente, a protease A transformava-os em aminoácidos e peptídeos de pequeno peso molecular.

Contudo, LURTON et al. (1989) preveniram que o mecanismo enzimático atuante a pH 3 (como o dos vinhos espumantes) é muito diferente do observado em outras faixas de pH e é caracterizado pela ação dominante de duas enzimas : a protease A e a carboxipeptidase Y. A primeira, única protease ácida caracterizada em *S. cerevisiae*, tem um papel dominante, pois sua inibição pela pepstatina bloqueia toda proteólise. Contudo, a ação hidrolítica própria da protease A não pode explicar a totalidade da proteólise e, principalmente, a liberação de aminoácidos, pois ela é exclusivamente uma endoprotease: essa discordância evidencia seu papel ativador de outras enzimas (LENNEY et al., 1974), marcadamente a carboxipeptidase Y que aparece como a principal exopeptidase atuando no pH do vinho.

2.4.2 Ação proteolítica extra-celular

HOUGH & MADDOX (1970) notaram a presença de uma ampla atividade proteolítica no sobrenadante (de pH 7,0) de uma cultura de *S. cerevisiae*.

Foi identificada a ação da protease A da levedura na cerveja, principalmente após a fermentação alcoólica e durante o período de maturação (DREYER et al., 1983), o que indica que essas enzimas devam ter sido liberadas de células em processo de autólise.

Contudo, BILINSKI et al. (1988) não detectaram proteases no mosto de cerveja.

Segundo SLAUGHTER & NOMURA (1992a) somente a protease B é capaz de ser liberada para o meio de cultura de células de leveduras *S. cerevisiae* em processo de autólise; talvez por ser a protease de menor tamanho. Paralelamente, os mesmos autores identificaram o polipeptídeo inibidor específico da protease B no meio desde os primeiros estágios da autólise.

Porém, BREDDAM & BEENFELDT (1991) citaram que a carboxipeptidase Y pode ser liberada no meio através da autólise de células de leveduras plasmolisadas por solventes.

2.4.3 Ação de β -glucanases

Saccharomyces cerevisiae contém ambos endo e exo- β -1,3- e β -1,6-glucanases (ABD-EL-AL & PHAFF, 1969), (BACON et al., 1970), (RYAN & WARD, 1985), que contribuem para o processo de autólise (ARNOLD, 1972).

Porém, a ação isolada de β -glucanases não provoca a lise de células de leveduras; somente a atividade sinérgica de glucanases e proteases desestrutura, suficientemente, o envelope celular para provocar o fenômeno de autólise (SCOTT & SCHEKMAN, 1980).

KITAMURA (1982) observou que somente a ação prévia de proteases na camada externa do envelope celular de leveduras (formada por um complexo de

mananos-proteínas) conjuntamente com a ação de β -1,3-glucanases na camada interna (formada de glucanos) provoca o fenômeno de autólise (HUNTER & ASENJO, 1987 e 1988).

RYAN & WARD (1985) evidenciam o interesse do uso de β -glucanases no processo autolítico. Incubando células de levedura 55°C/24 horas, obteve-se 29% de rendimento do processo de autólise (em relação ao peso seco de células de leveduras), contra 44% com a adição de 1% de papaína. A adição de β -1,3-glucanase ao tratamento com papaína provocou um dramático aumento no rendimento do extrato: 67%, 85% e 89% para 5, 20 e 45 unidades de β -1,3-glucanase respectivamente.

2.4.4 Ação de lipases e nucleases

Como a autólise de leveduras está associada com a degradação inicial da membrana citoplasmática de natureza lipoprotéica, supõe-se que fosfolipases estejam envolvidas no processo (BABAYAN & BEZRUKOV, 1985).

Os vacúolos de *S. cerevisiae* contém proteases, nucleases e esterases (BABAYAN & BEZRUKOV, 1985).

DE ROOIJ & HAKKAART (1985) sugeriram a degradação enzimática das células inativas de leveduras por preparações enzimáticas que apresentassem ação proteolítica, de β -glucanases, de fosfodiesterases e lipolítica.

2.5 Fases da autólise nos vinhos espumantes

BABAYAN & BEZRUKOV (1985) descreveram o processo catabólico da proteólise em quatro etapas:

a) Desorganização das endoestruturas celulares, permitindo a liberação de enzimas líticas que tem localização essencialmente vacuolar;

b) Interação das enzimas liberadas com seus inibidores específicos, localizados no citoplasma, seguida da digestão desses inibidores (ativação das proteases);

c) Hidrólise das proteínas celulares pelas proteases;

d) Saída da célula dos produtos da autólise de tamanho suficiente pequeno para atravessar a parede, que não se rompe durante o processo.

Tradicionalmente, o processo de autólise na elaboração de vinhos espumantes é descrito em quatro estágios principais (KELLY-TREADWELL, 1988), (PERIN & LLORCA, 1974):

Estágio 1 - Segunda fermentação: assimilação de nitrogênio, não há atividade proteásica ou autólise;

Estágio 2 - Liberação passiva de nitrogênio, não há atividade proteásica ou autólise (FEUILLAT & CHARPENTIER, 1982);

Estágio 3 - Fase de latência: pequena liberação de aminoácidos, atividade proteásica mínima no final do estágio, não há autólise. Corresponde a um período de 3 a 12 meses após o início do contato das células de leveduras com o vinho espumante (SUAREZ et al., 1979). É possível que este período de latência entre 3-9 meses, preliminar à autólise, corresponda ao período de mudança da endoestrutura

celular necessária à liberação de compostos de baixo peso molecular (CHRENOVA et al. apud KELLY-TREADWELL, 1988, p.64);

Estágio 4- Autólise: Grande liberação de nitrogênio; podendo se estender por um longo período (até alguns anos), aumento da atividade proteolítica. Segundo FEUILLAT & CHARPENTIER (1982), o período de maior enriquecimento em compostos nitrogenados ocorre entre o 6º e o 12º mês com um aumento total de 24,5% de aminoácidos (em relação ao vinho base) em comparação com um aumento total de 25,6% da mesma amostra após um período de 4 anos de maturação.

Em especial, evidenciou-se a baixa atividade proteásica intracelular e, conseqüentemente, a baixa liberação de aminoácidos nos meses subsequentes à fermentação alcoólica (BIDAN et al., 1985).

Esse período de baixo rendimento enzimático é evidenciado na Tabela 5, entre o 4º e o 7º ou 8º mês de maturação do vinho espumante sobre as leveduras. Segundo o autor, existe uma importante relação entre a atividade enzimática intracelular das leveduras e sua autólise.

TABELA 5. Evolução da proteólise intracelular das leveduras durante a elaboração de vinhos espumantes.

Momento de amostragem das leveduras:	N solubilizado durante a extração das proteases ($\mu\text{g N/ml}$)	Atividade proteásica intracelular ($\mu\text{g N/ml/6h}$)
Início da segunda fermentação	976	580
Final da segunda fermentação	615	471
4 meses de maturação	120	170
5 meses de maturação	116	64
6 meses de maturação	103	27
9 meses de maturação	340	255

Valores resultantes da adição de 1 ml de autolisado enzimático em uma solução de 0,5 % de hemoglobina, pH 3,7 / 37°C.

Fonte: FEUILLAT; CHARPENTIER (1982, p. 12).

FERRARI & FEUILLAT (1988) constataram que nos vinhos brancos da região de Borgonha na França (maturados sobre as leveduras) a atividade proteásica intracelular diminui bastante nos três primeiros meses, aumentando em seguida.

Mais recentemente, LEROY et al. (1990) acompanharam a evolução da atividade proteásica intracelular e a habilidade proteásica (quantidade de nitrogênio

solúvel liberado por uma massa de leveduras em meio hidroalcoólico pH 5 / 37°C / 48h) de cepas de levedura sob diferentes técnicas de propagação em maturação no vinho espumante (Figura 2):

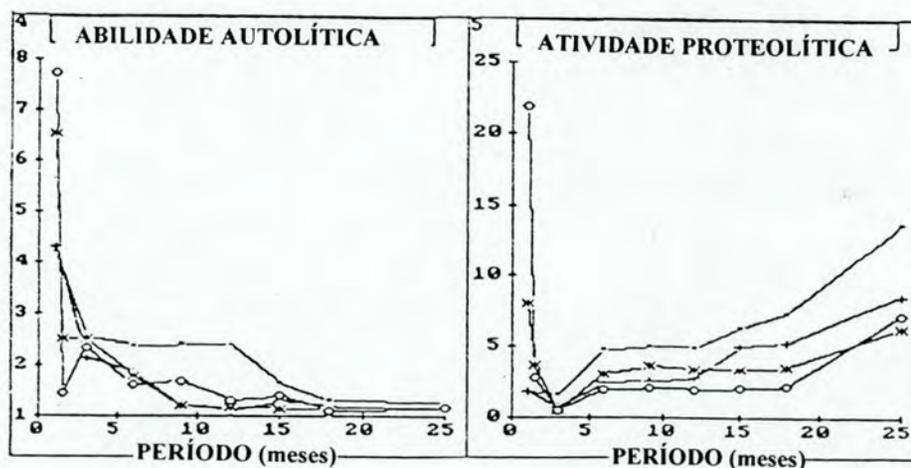


FIGURA 2. Evolução das atividades proteolíticas intracelulares durante a maturação dos ensaios com as cepas 001 propagada no vinho (001W) e propagada em mosto diluído (001M), e com a cepa 002 propagada no vinho (002W) e propagada no mosto diluído (002M).

Atividade proteásica expressa em $\mu\text{g N/mg}$ de proteína/ 12 horas.

Abilidade proteásica expressa em mg de N.

Tempo 0 equivale ao final da segunda fermentação alcoólica.

Fonte: LEROY et al., (1990, p. 22).

Na Figura 2, em relação a atividade proteásica e a habilidade proteásica, notam-se os valores mais altos no final da segunda fermentação alcoólica e, segundo minha opinião, somente essa atividade enzimática intensa e breve pode justificar a liberação no vinho espumante dos diversos compostos nitrogenados relacionados na Figura 1 durante os primeiros dez meses de maturação. Contudo, os autores citados justificam esse enriquecimento do meio de compostos nitrogenados pela difusão passiva da célula de levedura.

LURTON (1989) afirmou que a cinética da autólise no vinho em maturação sobre leveduras apresenta duas fases consecutivas:

a) A primeira, de duração de algumas semanas, corresponde a fase de declínio das leveduras e traduz-se por uma liberação intensa de compostos nitrogenados. A proteólise intracelular é máxima nesse período, durante o qual se produz igualmente a difusão da carga intracelular de aminoácidos, essencialmente ácido glutâmico, alanina e arginina acumulados sob a forma livre pelas leveduras durante a segunda fermentação alcoólica.

b) A segunda fase consiste numa proteólise lenta, prolongando-se por vários meses e traduzindo-se por um enriquecimento gradual do vinho em nitrogênio.

O mesmo autor provou que a liberação de nitrogênio aminado pelas leveduras, após o fim da fermentação alcoólica em um vinho tranquilo numa solução tampão pH 3 / 15°C ou 30°C, é resultante principalmente da ação proteásica intracelular através da comparação das dinâmicas de liberação de aminoácidos resultantes da inibição (difusão passiva) ou não das enzimas proteásicas (proteólise).

Nesse sentido, TAKEO et al. (1989) observaram uma drástica diminuição da densidade da membrana plasmática (composta de proteínas), devido à ação hidrolítica das proteases após 5 horas do início do período de incubação (fase pós fermentativa) à 46°C.

LURTON (1989) observou que após 4 meses de maturação das leveduras a 15°C em um vinho branco, 70% do conteúdo nitrogenado intracelular foi liberado, dos quais 20% apesar da inibição das proteases. A ação enzimática permitiu então, a liberação de aproximadamente 50% do conteúdo proteico celular como pode-se concluir da Tabela 6.

TABELA 6. Liberação de nitrogênio total, aminado e aminoácidos pelas leveduras após 7 e 120 dias de autólise a 15°C. A inibição total da proteólise é obtida pela ação conjunta de fenilmetilsulfonilfluoreto 5mM, HgCl₂ 5mM, EDTA 5mM e pepstatina 50 M. Os resultados são expressos em porcentagem do conteúdo nitrogenado das leveduras antes da autólise.

		Testemunha	Inibição
total			
	Nitrogênio total (%)	24	13
7 dias de	Nitrogênio aminado (%)	8	4
autólise	Aminoácidos (%)	3	2
120 dias	Nitrogênio total (%)	70	20
de			
autólise	Nitrogênio aminado (%)	20	4

Fonte: LURTON (1989, p. 38).

2.6 Opções de otimização da autólise de leveduras nos processos de elaboração de vinhos espumantes

2.6.1 Homogeneizações da biomassa com o vinho espumante

SUAREZ et al. (1979), citaram que a homogeneização das células de levedura no vinho espumante, após 4, 12, 22 e 40 meses de maturação, não aumentaram a taxa de autólise nem a concentração de aminoácidos livres.

Contudo, MOLNÁR et al. (1980a), reportaram que a mistura do vinho espumante com as leveduras responsáveis pela segunda fermentação alcoólica durante o período de maturação a cada 20 dias resultou em um aumento da taxa de autólise em 1,5 a 4,2%.

2.6.2 Tratamento térmico do vinho espumante em contato com as leveduras

Essa técnica consiste em aquecer o vinho espumante em presença das leveduras responsáveis pela segunda fermentação, as quais são suspensas por agitação (BIDAN et al., 1985). As temperaturas utilizadas, assim como a duração do tratamento, são variáveis, situando-se entre 35 a 65°C durante 2 a 5 dias.

Vários autores relacionam a liberação de compostos nitrogenados de baixo peso molecular como resultante do tratamento térmico (COLAGRANDE & SILVA, 1981a e b), (COLAGRANDE et al., 1984).

Embora tal processo possa trazer um enriquecimento imediato de compostos nitrogenados potencialmente interessantes para a qualidade do vinho espumante, o processo de hidrólise enzimática intracelular é bloqueado pela inativação das proteases da levedura pelo tratamento térmico como foi discutido anteriormente (Item 2.3.1).

Contudo, a melhoria organoléptica seria uma consequência também do enriquecimento do vinho espumante em aminoácidos sulfurados, apresentando um poder redutor importante (PARONETO apud COLAGRANDE & SILVA, 1981a, p.180).

Porém, comparando organolépticamente vinhos espumantes mantidos ou não sobre células de leveduras por um período de 90 dias nas temperaturas de 10, 20 e 30°C, MOLNÁR et al. (1981) observaram que o aumento de temperatura diminui proporcionalmente a qualidade do produto.

Em relação ao enriquecimento do vinho espumante em colóides, constituindo-se também em elementos potencialmente qualitativos, o tratamento térmico parece trazer um enriquecimento de polissacarídeos (LLAUBÈRES et al., 1987), mas uma diminuição dos colóides de alto peso molecular, que são os responsáveis pela possível melhoria organoléptica que o produto poderia obter (LUBBERS et al., 1993), especialmente quando se utilizam temperaturas na faixa de 50 C durante 72 horas (FEUILLAT & GIZZI apud BIDAN et al., 1985, p.31).

2.6.3 Adição de extratos de leveduras

Extratos de leveduras representam concentrados de componentes solúveis da célula de levedura obtidos por processos autolíticos, plasmolíticos ou físico-químicos (BÉHALOVÁ et al., 1991).

Técnicamente, diferenciam-se extratos de leveduras e autolisados de leveduras pela presença de fragmentos do envelope celular das células, como consequência do processo de obtenção do produto, nos autolisados de leveduras.

Autolisados de leveduras podem ser obtidos a partir da ação de enzimas endógenas à célula, esse produto é bem conhecido como um aditivo alimentar. A autólise pode ser induzida pela incubação das células de leveduras em temperaturas elevadas, pela adição de solventes orgânicos (como acetato de etila e tolueno), pelo uso de uma concentração determinada de sal (cloreto de sódio), pela introdução de enzimas proteolíticas ou uma combinação desses métodos. Isso resulta na inativação das células de leveduras, mas as enzimas intracelulares permanecem ativas e são disponíveis para realizar a degradação de biopolímeros (DE ROOIJ & HAKKAART, 1985).

A adição de extratos de leveduras aos vinhos espumantes objetiva a melhoria das qualidades organolépticas do produto, em especial os aromas, diminuindo o tempo de conservação sobre leveduras (BIDAN et al., 1985).

O extrato de leveduras para uso no processo de elaboração de vinhos espumantes pode ser obtido pelas seguintes etapas (FEUILLAT, 1986):

Biblioteca
de Alimentos

- a) Escolha da cepa de levedura, obrigatoriamente de vinificação, com caráter proteásico pronunciado;
- b) Incubação das leveduras em um meio apropriado, semelhante ao vinho, para promover o aumento da biomassa durante 48 horas;
- c) Escolha da temperatura de incubação (esse fator é fundamental na determinação da capacidade autolítica residual) entre 25 e 55°C;
- d) Centrifugação para separação do sobrenadante das cascas de leveduras;
- e) Opção de liofilização ou secagem do sobrenadante para obtenção de um extrato parcial ou totalmente desidratado. A temperatura utilizada no processo de secagem condiciona a capacidade autolítica residual.

Segundo o mesmo autor, os extratos podem ser preparados a partir de leveduras secas simplesmente reidratados.

2.6.3.1 Efeitos da adição de extratos de leveduras aos vinhos espumantes

a) Efeitos sobre a cinética da segunda fermentação alcoólica

Quando a segunda fermentação alcoólica é realizada em garrafas, obrigatoriamente o extrato é adicionado antes da segunda fermentação, o que implica numa multiplicação das leveduras mais importante nos vinhos enriquecidos, principalmente, quando se utilizam autolisados de leveduras (sem a separação das cascas) (BIDAN et al., 1985), (FEUILLAT, 1986).

b) Efeitos sobre a composição do vinho espumante

Segundo FEUILLAT (1986), os vinhos espumantes adicionados com autolisados ou extratos de leveduras possuem teores mais elevados de nitrogênio total no final da segunda fermentação e mantêm-se assim durante todo o período de maturação (Tabela 7). O mesmo conceito pode ser aplicado aos aminoácidos.

TABELA 7. Dosagem dos aminoácidos (mg/l) de um vinho espumante enriquecido ou não de autolisados de leveduras na dose de 1 g/l.

	TESTEMUNHA	SDE	SDS
LYS	9,45	13,05	13,55
HIS	2,95	4,10	4,10
ARG	96,30	99,50	104,30
ASP	3,35	4,70	4,20
THR	2,90	4,35	3,75
SER	3,80	5,10	5,10
GLU	8,70	11,40	10,70
GLY	3,50	4,10	3,05
ALA	15,00	17,70	14,60
VAL	2,50	4,40	3,80
MET	1,40	2,00	2,25
ILE	0,85	1,80	1,50
LEU	2,90	4,65	5,15
TYR	1,15	1,85	1,95
PHE	1,50	2,50	2,35
TOTAL	157,35	181,2	181,45

SDE= Autolisados de levedura.

SDS= Extratos de levedura.

Período de maturação de 2 anos.

Fonte: BIDAN et al. (1985, p. 33).

Extratos de leveduras foram experimentados em doses de 1 a 1,5 gramas de peso seco por litro nos vinhos espumantes, correspondendo a um aumento de

nitrogênio total de 70 a 150 mg/l, ou seja 16 a 34 % em relação a testemunha em processo normal de maturação (BIDAN et al., 1985).

Segundo FERRARI & FEUILLAT (1988) a adição de autolisados de leveduras em vinhos brancos da região de Borgonha na França provocam um aumento dos teores de arginina, ácido glutâmico, alanina e leucina, principalmente.

LEROY et al. (1990) demonstraram que, além do enriquecimento em nitrogênio total, os vinhos espumantes adicionados de leveduras utilizadas na segunda fermentação alcoólica, ou leveduras desidratadas e pulverizadas, são mais ricos em ácidos nucleicos.

c) Consequências qualitativas da adição de extratos de leveduras no vinho espumante

Pode-se inferir que o enriquecimento do vinho espumante em compostos potencialmente qualitativos (aminoácidos, nucleotídeos, glicoproteínas) pela adição de extratos de leveduras tragam um ganho de qualidade ao produto.

FEUILLAT (1986), analisando o efeito da adição de extratos de leveduras (1g/l em peso seco) ao vinho espumante após 36 meses de maturação, obteve os seguintes resultados:

TABELA 8. Avaliação sensorial de um vinho espumante após 36 meses de envelhecimento sobre as leveduras.

Características*:	Vinho espumante + extrato de leveduras:	Vinho espumante (processo normal)	Vinho espumante + autolisados de leveduras:
Cor	39,5	35,5	37,5
Persistência da espuma:	36,5	28,5	20
Aroma:	51	35,5	19
Sabor:	49	36,5	24
Total de pontos:	176	136	100,5

* De acordo com a análise de KRAMER, as diferenças observadas são significativas à 5% para todas as características menos para a cor.

Fonte: FEUILLAT (1986, p. 13).

Os vinhos espumantes elaborados a partir de um vinho base com teores modestos de nitrogênio total têm a tendência de aproveitar melhor o acréscimo organoléptico trazido pela adição de autolisados ou extratos de leveduras, principalmente quando o período de maturação é inferior a 12 meses. Os vinhos espumantes pobres em nitrogênio pela limitada troca com a biomassa, além de possuírem uma pior percepção organoléptica, apresentam defeitos de espuma: falta de fineza e persistência além de envelhecerem mais rapidamente (BIDAN et al., 1985), (FEUILLAT, 1986).

Nesse caso, os vinhos espumantes brasileiros podem beneficiar-se de tal opção tecnológica, visto que o teor médio de nitrogênio total de 22 amostras de produtos elaborados em 10 dos principais estabelecimentos vinícolas é bem inferior

àquele indicado para os vinhos espumantes italianos e franceses (RIZZON et al., 1994).

Contudo, USSEGLIO-TOMASSET et al. (1983) determinaram que as trocas entre o vinho espumante e as leveduras não são as responsáveis pelo ganho qualitativo do produto durante a fase de maturação a partir de análises laboratoriais e organolépticas realizadas em um ensaio, em que se compara a composição e a qualidade de vinhos espumantes mantidos ou não em contato com as células responsáveis pela segunda fermentação alcoólica. Segundo os autores, o ganho de qualidade obtido após a fase de maturação do vinho espumante seria consequência da evolução e do refino obtidos nessas condições pelo produto.

CIOLFI et al. (1990) descreveram o potencial qualitativo do uso de extratos de leveduras antes da fermentação alcoólica na obtenção de produtos mais ricos aromaticamente, através do aumento da taxa de fermentação e uma maior síntese de produtos voláteis (ésteres e ácidos graxos) que dão origem a um produto com melhores características organolépticas. A atividade de ésteres sintetases é, particularmente, aumentada durante a fermentação. O poder ativador do extrato é mais evidente quando as leveduras que deram origem ao extrato são da mesma cepa das beneficiárias da ativação.

d) Efeitos sobre a cinética do processo de autólise durante a maturação dos vinhos espumantes sobre as leveduras

A adição de autolisados de leveduras *S. cerevisiae* em uma proporção de 15% a uma suspensão de leveduras (10% peso seco / peso total) provocou um

substancial aumento dos compostos nitrogenados liberados no sobrenadante durante um período de 24 horas à 50°C: quase 70% do conteúdo nitrogenado intracelular foi liberado nessas condições contra menos de 50% do conteúdo intracelular liberado com o uso de 5% de etanol (BÉHALOVÁ et al., 1991).

Da mesma forma, a efetividade da adição de autolisados de leveduras foi comparada com iniciadores clássicos da autólise (cloreto de sódio e etanol) na indução do processo de autólise de leveduras por KOLLAR et al. (1991). A adição de 15% em volume de autolisado de leveduras provocou a liberação de mais proteína (54,7%) das células de leveduras do que os outros indutores da autólise em um período de 24 horas: controle (26,3%), cloreto de sódio 5% em peso (46,3%) e etanol 5% vol (50,9%).

2.6.3.2 Fatores bioquímicos a considerar na obtenção de extratos de leveduras

a) Crescimento das células de leveduras em altas temperaturas

Segundo YAMAMURA et al. (1991), quando se cresce células de *S. cerevisiae* em altas temperaturas (36, 38 e 40°C) em um meio complexo, contendo uma alta concentração de extrato de leveduras (6%), ocorre uma alteração da membrana plasmática (na sua composição lipídica e fluidez) e, conseqüentemente, da parede celular que aumenta a capacidade autolítica (medida pela liberação de compostos nitrogenados solúveis), apesar de diminuir a taxa de crescimento (Tabela 9).

TABELA 9. Comparação do grau de autólise da célula de levedura em relação ao volume de cultura e das condições de crescimento.

Temperatura cultivo (°C)	Crescimento (mg/ml cultura)	Compostos nitrogenados liberados:	
		por mg de células	por ml de cultura
30	11,7	6,0	70,2
36	9,7	38,1	369,6
38	7,4	55,6	411,4
40	2,7	63,3	170,9

Fonte: YAMAMURA et al. (1991, p. 2863).

Essa condição limite de crescimento também poderia ser a responsável pela regulação do inibidor da protease A, induzindo a uma menor síntese e, conseqüentemente, aumentando a capacidade autolítica da célula pela maior presença da protease A "livre" (BECK et al., 1980).

b) Capacidade autolítica das cepas de *S. cerevisiae*

BIDAN et al. (1985) descreveram uma experiência, na qual se compararam cinco cepas de leveduras (todas da espécie *S. cerevisiae*) cultivadas em condições idênticas em um reator regulado a 25°C / pH 3,5 em um vinho diluído de título 3,6 %vol de álcool. As leveduras foram recolhidas por centrifugação no final da fase de crescimento exponencial e após, congeladas e secas por liofilização. Os autores observaram uma ampla variação das atividades proteolíticas intracelulares estabelecidas para cada uma das cepas rehidratadas.

c) Capacidade autolítica das leveduras em função do tempo de maturação em condições determinadas

Demonstrou-se, anteriormente, que a atividade proteásica intracelular, conseqüentemente a autólise, é relativamente baixa em células de levedura em maceração em vinhos espumantes durante um período que situa-se aproximadamente entre o segundo e o oitavo mês.

Se pensarmos na reutilização de "fundos de tanques" de fermentações de vinhos espumantes para a obtenção de extratos, devemos priorizar a utilização da biomassa com maior potencial proteásico e, conseqüentemente, maior liberação de aminoácidos.

Nesse sentido, FEUILLAT & CHARPENTIER (1982) demonstraram que existe uma ação enzimática intracelular mais intensa nas células em maturação no vinho espumante ocorre antes da fase de baixa atividade enzimática, ou seja, antes do terceiro mês de maturação, com conseqüente maior liberação de compostos nitrogenados.

Considerando-se, porém, a utilização de células de leveduras liofilizadas, o período de maior atividade enzimática foi após 5 horas o início do processo de indução do fenômeno de autólise, através da incubação das células à 48-50°C em uma solução de 2% de tolueno em pH variando de 2,0-12,0 (NEKLYUDOV et al., 1993).

d) Utilização de extratos (sobrenadante) ou autolisados de leveduras (sobrenadante e cascas)

FEUILLAT (1986), analisando as medidas das atividades proteásicas intracelulares realizadas nos depósitos de leveduras em diferentes etapas da maturação do vinho espumante, concluiu que as atividades são sempre menores nos depósitos provenientes de vinhos enriquecidos em autolisados inteiros do que nos depósitos provenientes de vinhos enriquecidos pelo extrato e no vinho testemunha. Supõe-se que os autolisados tragam inibidores enzimáticos que reprimam a autólise.

Porém, outros autores demonstraram que o sedimento separado por centrifugação é mais rico em atividade proteásica (MATERN et al., 1974), (NEKLYUDOV et al., 1993).

Contudo, o uso de autolisados de leveduras provoca consequências organolépticas desvantajosas frente ao uso de extratos de leveduras na qualificação dos vinhos espumantes como observou FEUILLAT (1986).

2.6.3.3 Características qualitativas desejáveis em um extrato de leveduras

Extratos de leveduras podem ser preparados pela ação enzimática intracelular ou por hidrólise, usando-se enzimas, ácidos ou bases. Entre esses métodos, a autólise por auto-digestão é o método que permite a obtenção de um produto de maior qualidade (TANEKAWA et al., 1980).

As leveduras contêm de 6 a 12% de ácidos nucleicos e a maior relação RNA / DNA entre os microrganismos. A preservação do caráter de polímero das cadeias durante a obtenção dos extratos é desejável: ácidos nucleicos polimerizados são uma fonte de 5'-nucleotídeos, dentre os quais guanosina-5-monofosfato (GMP) e inosina-5-monofosfato (IMP) que possuem a capacidade de enaltecer o gosto e o aroma dos produtos alimentares (BÉHALOVÁ et al., 1991).

Segundo NAGODAWITHANA (1992), o GMP e o IMP tem a capacidade de sinergismo com o glutamato formado durante a autólise das células, aumentando sua capacidade enaltecida de gostos e aromas, além de reduzir notas amargas no alimento. O grau de estímulo da superfície receptora do gosto (papilas gustativas), provavelmente, está relacionada com o tempo de estímulo e a frequência de interações entre o estímulo gustativo e o receptor. Como essas interações são fracas com uma alta reversão, o estímulo gustativo pode ser muito fraco sem a ajuda de uma ligação química. É bastante provável que moléculas de cinco átomos de carbono carregados a parte (como no glutamato) pode providenciar um certo grau de ancoramento necessário a manter a molécula de sabor em proximidade com o sítio receptor, as papilas gustativas, de tal maneira que o sabor fique enaltecido.

Contudo, durante o processo de obtenção do extrato de leveduras pela autólise, o RNA intracelular é normalmente decomposto em substâncias de baixo peso molecular não-flavorizantes como nucleosídeos ou bases; conseqüentemente, a quantidade de GMP, supondo-se que ele seja formado durante a autólise, é muito pequena para melhorar a qualidade do extrato. Quando a autólise é realizada em pH abaixo de 6,0, a formação de GMP (5'-GMP / peso seco de leveduras da extração em percentagem) é de zero a 0,17% (TANEKAWA et al., 1980).

Porém, TANEKAWA et al. (1980) descreveram que 50-80% do RNA intracelular permanece não decomposto, quando a autólise de leveduras é realizada em uma faixa de pH constante de 6,2 a 6,4 (30-60°C / 10-30 horas). Nesse caso, o RNA intracelular remanescente pode ser facilmente hidrolisado em 5'-nucleotídeos pela ação de enzimas específicas (5'-fosfodiesterase e AMP deaminase), de modo a formar um extrato rico em 5'-nucleotídeos flavorizantes como GMP ou IMP.

Nesse sentido, DE ROOIJ & HAKKAART (1985) sugeriram a degradação enzimática das células inativas de leveduras por preparações enzimáticas que abrangem a ação de fosfodiesterases (obtidas de radículas de malte ou fungos), objetivando a degradação do RNA com produção de 5'-ribonucleotídeos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais de experimentação

3.1.1 Microrganismos

Utilizaram-se leveduras liofilizadas de vinificação *Saccharomyces cerevisiae* (marca Uvaferm CGC62 da empresa Danstar Ferment-L'Allemand).

3.1.2 Meios de cultura

Utilizou-se um meio de cultura composto por extrato de leveduras (5g/l da marca Oxoid/Unipath Ltda; England), peptona de carne (10g/l da marca Oxoid/Unipath Ltd; England), glicose (20g/l da marca LabSynth Ltda; SP/Brasil) e água destilada. Autoclavou-se o meio 30min/120°C.

3.1.3 Tampões e soluções padrões

3.1.3.1 Tampão hidroalcoólico

Utilizou-se um tampão hidroalcoólico de composição semelhante ao vinho espumante (FEUILLAT, 1986): ácido tartárico (4g/l da marca Vetec/Química

Fina Ltda; RJ/Brasil), ácido málico (3g/l da marca Merck; Germany), ácido acético (0,1g/l da marca LabSynth Ltda; SP/Brasil), sulfato de potássio (0,1g/l da marca Vetec/Química Fina Ltda; RJ/Brasil), sulfato de magnésio (0,025g/l da marca Merck/Merck S.A. Indústrias Químicas; RJ/Brasil), etanol (10% vol/vol da marca LabSynth Ltda; SP/Brasil) e água destilada. Ajustou-se o pH a 3,0 com NaOH 3N (da marca Vetec/Química Fina Ltda; RJ/Brasil).

3.1.3.2 Tampão fosfato

Utilizou-se um tampão fosfato de pH 7,0 preparado a partir de fosfato de sódio dibásico (0,1 M), fosfato de sódio monobásico (0,1M) e cloreto de magnésio (0,01M). Todos os reagentes são da marca Reagen/Quimibrás Indústrias Químicas S.A.; RJ/Brasil.

3.2 Método de crescimento da cultura de células

Adicionou-se as leveduras secas ativas ao meio de cultura sob condições próximas a esterilidade numa concentração de 1g/l. Cultivou-se as células a 30°C/36 horas em agitação contínua (200 rpm) em uma incubadora-agitadora (modelo G25, New Brunswick Scientific; USA). Nessas condições as células de levedura encontravam-se na fase estacionária de crescimento no final do período (mantendo uma viabilidade superior à 95% segundo SLAUGHTER & NOMURA (1992).

3.3 Método de recuperação da biomassa

Centrifugou-se (centrífuga de bancada da marca Excelsa 2/Fanem Ltda; SP/Brasil) a biomassa no meio de cultura (5000 rpm / 20 min) em uma temperatura de 10°C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em água destilada. Repetiu-se as operações nas mesmas condições. Filtrou-se a solução em um suporte de filtração Millipore (Sterifil Aseptic System, 47mm/Millipore Corporation; Japan) através de um tamanho de poro de 0,45 μ m em uma pressão de vácuo de 20 pol. de mercúrio. Após o escoamento do líquido, manteve-se a pressão negativa durante alguns minutos de maneira a formar uma torta compacta. Determinou-se a umidade pela diferença de peso antes e após a secagem da torta a 90°C/48 horas.

3.4 Método de ressuspensão da biomassa

Ressuspendeu-se a biomassa de células de maneira a manter uma concentração celular de 0,50g da biomassa úmida/10ml de tampão hidroalcoólico (tratamentos térmicos da biomassa) ou tampão fosfato (tratamentos de ruptura ou permeabilização do envelope celular).

3.5 Métodos de ruptura ou permeabilização do envelope celular

A desintegração mecânica das células das leveduras leva a liberação das enzimas do complexo autolítico contidas nos vacúolos, induzindo o processo de autólise (BABAYAN & BEZRUKOV, 1985).

Os sistemas mecânicos de ruptura de células podem ser divididos em métodos baseados em forças de atrito sólidas e forças de atrito líquidas. Essas forças podem envolver tanto a ação moedora em uma "ball-mill" como a extrusão de células congeladas através de aberturas estreitas sob alta pressão. Exemplos desse método são as prensas Francesas, Eaton e Prensas-X. Entre os equipamentos que se utilizam forças de atrito líquidas, o homogeneizador de alta pressão é o método mais estudado e o que apresenta as melhores possibilidades de utilização industrial (VAN GAVER & HUYGHEBAERT, 1989).

Existem vários métodos laboratoriais para a ruptura ou permeabilização do envelope de células de leveduras, a maioria dos quais utiliza equipamento especial para tal. Privilegiou-se a seleção de métodos que dispensam a adição de substâncias químicas incompatíveis com a elaboração de um produto alimentar, ou de produtos enzimáticos que inviabilizassem economicamente o processo, ou seja, métodos que tivessem uma possível utilização industrial.

3.5.1 Uso de pérolas de vidro

Nesse método, as suspensões de células são agitadas violentamente com partículas abrasivas que produzem forças de atrito dentro do líquido. As desvantagens desse método são a remoção das partículas, inteiras ou desintegradas, e a geração de calor.

Segundo BÉHALOVÁ & BERAN (1979), a desintegração celular de leveduras com o uso de pérolas de vidro acelera e aumenta o rendimento do

processo de autólise, em comparação com a permeabilização do envelope celular com o uso de clorofórmio (2%), (Tabela 10).

TABELA 10: Comparação de procedimentos de autólise de células de *S. cerevisiae*.

Células:	Rendimento em peso seco(%):	Rendimento em nitrogênio(%):	Duração (horas):
Desintegradas (pérolas de vidro):	69	92	8-10
Não desintegradas (clorofórmio):	50	70	24-48

Fonte: BÉHALOVÁ & BERAN (1979).

A ação atritante de pérolas de vidro produzida por oscilação ou vortex pode ser obtida utilizando um propulsor de rápida rotação em um recipiente cilíndrico.

Adicionou-se pérolas de vidro (Glasperlen 0,45x0,50 mmØ; B.Braun Melsungen AG) à suspensão de células e submeteu-se a mistura a um regime de vortex durante 5 minutos em um agitador de tubos (modelo 251/Fanem Ltda; SP/Brasil). Recuperou-se o sobrenadante e centrifugou-se (4000rpm/10min). O sobrenadante obtido é o extrato bruto de leveduras.

3.5.2 Sonicador

A desintegração ultrasônica é o método mais fácil e limpo de ruptura celular, embora nem sempre seja eficiente (CAMPBÉLL & DUFFUS, 1988).

O método de irradiação ultrasônica é extensivamente utilizada para desintegrar células biológicas, visando a liberação de compostos intracelulares. Microbolhas formam-se em vários sítios de nucleação durante a fase de rarefação da onda sonora. Estas bolhas crescem e, durante a fase de compressão, o conteúdo da bolha é comprimido para um raio mínimo; nesse momento a bolha colapsa, liberando uma violenta onda de choque que se propaga no meio. O fenômeno, envolvendo a formação, crescimento e colapso de bolhas de gás ou de vapor devido à ação de intensas ondas sonoras, é denominado de cavitação. A desintegração de células em campos de cavitação ultrasônica ocorre devido às forças mecânicas formadas pelas ondas líquidas (DOULAH, 1977).

Utilizou-se um sonicador com "microtip" de 500 W de capacidade (Ultrasonic Homogeneizer 4710/Cole-Parmer Instrument Co.; Chicago/USA) com uma frequência de saída de 20 kHz. A sonda de condução deve ser centrada no recipiente de ensaio e a extremidade não deve ser submersa além de 10 cm. A temperatura não deve ser superior a 5°C.

Submeteu-se a suspensão de células a tratamentos de 10 minutos, alternando 30 segundos de pulso / 10 segundos com o aparelho desligado, de maneira a não aquecer a amostra, as quais foram mantidas em banho de gelo durante o tratamento.

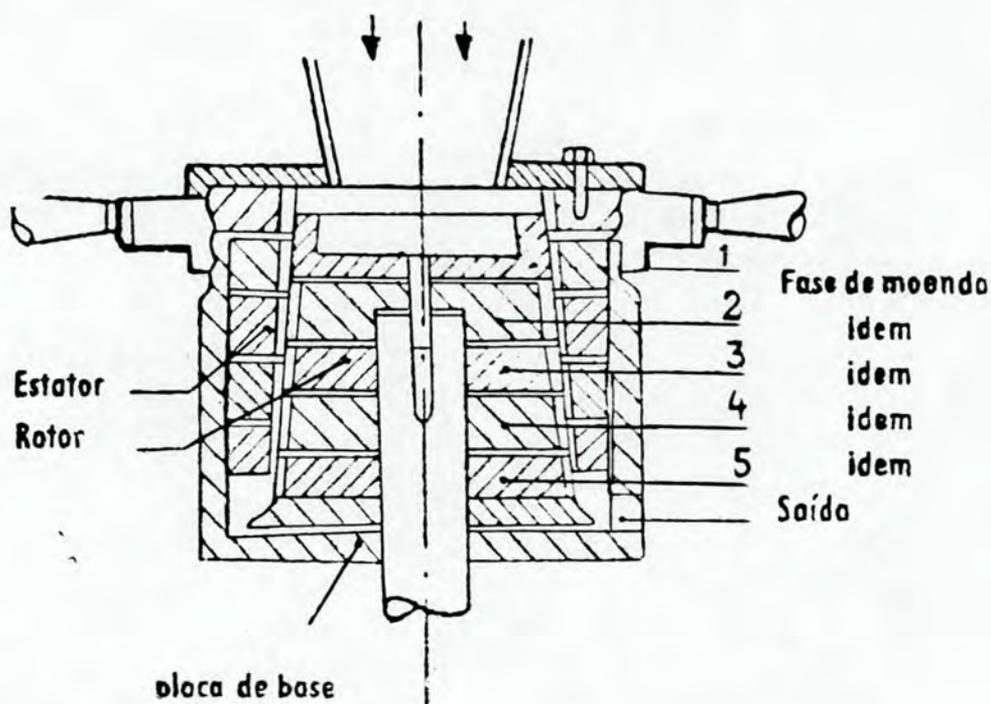
3.5.3 Moinho de vibração coloidal

Utilizou-se um aparelho Puc-Vikosator (Kolloidtechnik type JV-14/Probst & Class, Western Germany) que provoca a ruptura das células em uma suspensão através de forças de atrito e vibração gerada entre as partículas da suspensão e o eixo de rotação. A massa líquida é conduzida a passar por uma fenda microscópica (0,03-0,05mm), onde gira o eixo em alta rotação, triturando as células contra as paredes externas do cilindro.

O moinho de vibração coloidal consiste, nas suas partes essenciais, de um estator em forma de anel, com 2-5 engrenagens diferentes e de um rotor com o mesmo sistema de engrenagens, que gira no interior do estator (Figura 3). Uma outra fase, a do início do rotor, é construída ou em forma giratória de 3 aletas (calota) ou como pré-triturador cilíndrico, que colhe o material, inicia a trituração e o lança na primeira fase dentada do estator. Em virtude da disposição cônica em um ângulo de 5° e da força centrífuga do rotor, que gira com 3000 rpm, o material a moer chega à segunda fase dentada através da fenda de moenda. Além de estar exposto a forças de golpe e de fricção, o produto é submetido a vibrações intensas na forma de pressões e de descargas alternadas. Este processo repete-se até o produto chegar a última fase dentada. Nesta última fase, o produto está exposto a uma frequência básica de vibração de 6200 Hz. A primeira vibração alta desta fase, com os seus 18600 Hz, está já no campo supersônico, o que explica a grande eficácia. Em seguida, o produto abandona o moinho de forma contínua pelo tubo de saída.

Realizou-se a passagem da suspensão das células 3 vezes consecutivas.

FIGURA 3. Esquema do estator e do rotor do moinho de vibração coloidal.



Fonte: Manual da aparelho (Kolloidtechnik Probst & Class GMBH).

3.5.4 Etanol absoluto (FENTON, 1982)

A autólise pode ser induzida através da plasmólise por vários solventes. A eficiência do tratamento depende da natureza do solvente, sua concentração e da duração do tratamento. A plasmólise, geralmente, não causa a liberação de moléculas de alto peso molecular como as enzimas. A taxa deste processo é bastante dependente do pH; no pH ótimo (em torno de 8.0) uma autólise completa realiza-se em 20h, usando os melhores solventes ou com uma variedade de detergentes iônicos e não iônicos. O clorofórmio e o éter parecem mais eficientes, mas em escala industrial eles são inaceitáveis pela sua toxicidade e risco de explosão (BREDDAM & BEENFELDT, 1991).

A plasmólise com solventes miscíveis com água como metanol, etanol, iso-propanol e t-butanol foram descritos por FENTON (1982), contudo eles parecem ser eficientes somente em altas concentrações (como 0,5 - 0,95g solvente/g de levedura prensada). Essas quantidades de solvente são danosas para várias moléculas biologicamente ativas. Uma influência benéfica do NaCl na plasmólise com etanol foi relatado, mas o processo ainda assim parece ineficiente, em particular em relação à duração do processo de autólise (em torno de 3 dias) segundo SUGIMOTO et al. (1972).

Neste tratamento utilizou-se a biomassa úmida e não a suspensão de células. Pesou-se uma massa determinada de biomassa úmida. Suspendeu-se a massa de células com etanol absoluto (da marca LabSynth Ltda; SP/Brasil) numa concentração (peso de solvente / (peso de solvente + peso da alíquota de células úmidas) de 80% durante 120 min. Filtrou-se as células, descartando-se o solvente e pesou-se a torta de leveduras. Ressuspendeu-se as células em tampão fosfato e aqueceu-se a suspensão à 30°C durante 24 horas. Centrifugou-se (4000rpm/10min) e recuperou-se o sobrenadante que é o extrato bruto de leveduras.

3.6 Método de realização dos tratamentos térmicos

A chamada "ótima temperatura" de uma enzima deve ser considerada antes como um parâmetro operacional, do que uma característica verdadeira (WHITAKER, 1972). Nesse sentido, a verdadeira discussão é determinar em que condições de temperatura o processo de liberação de compostos intracelulares de

potencial interesse qualitativo é mais eficiente, considerando-se um determinado período de tempo.

As células em suspensão no tampão hidroalcoólico (Item 3.4) foram submetidas a um tratamento térmico (20, 30, 40 ou 54°C) durante 48 horas. Após esse período a biomassa foi recuperada através das seguintes etapas: Homogeneizou-se as células no tampão hidroalcoólico e filtrou-se a solução em um suporte de filtração Millipore através de um tamanho de poro de 0,45µm em uma pressão de vácuo de 20 pol. de mercúrio, o sobrenadante foi separado (extrato 1). Após o escoamento do líquido manteve-se a pressão negativa durante alguns minutos, de maneira a formar uma torta compacta. Determinou-se a umidade da biomassa pela diferença de peso antes e após a secagem da torta a 90°C/48 horas.

Após os tratamentos térmicos, ressuspendeu-se a biomassa de células de maneira a obter uma concentração celular de 0,30g/10ml da biomassa úmida em tampão fosfato (pH 7,0) ou hidroalcoólico (pH 3,0) e desintegrou-se as células através do uso de pérolas de vidro (Item 3.5.1), obtendo-se um segundo extrato de leveduras (extrato 2).

A Figura 4 descreve o procedimento para a obtenção dos extratos celulares.

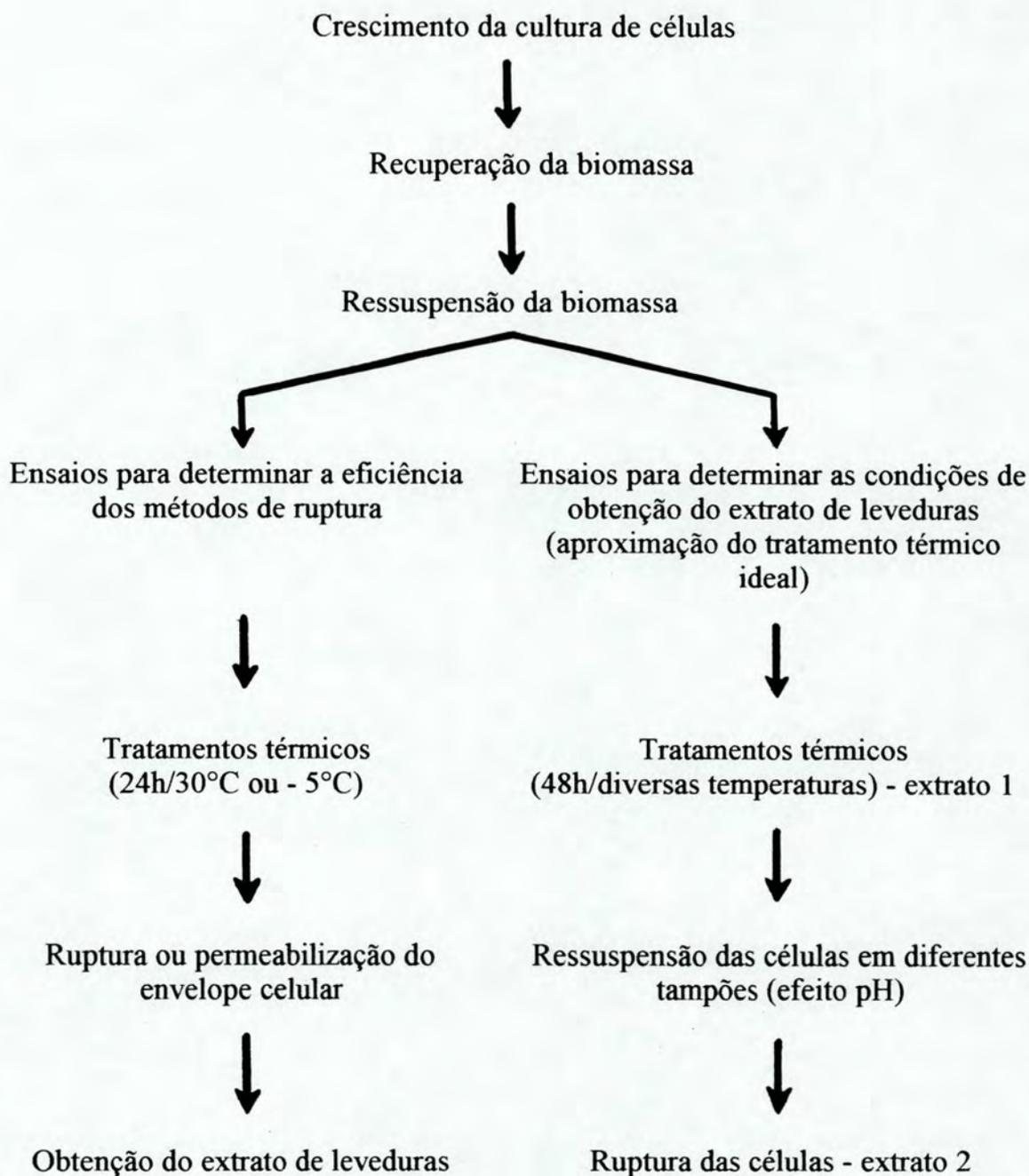


FIGURA 4. Representação esquemática dos processos de obtenção dos extratos celulares.

3.7 Métodos de análise

3.7.1 Análise da atividade enzimática pelo método de Grzywnowicz (GRZYWNOWICZ et al., 1989)

A azocaseína é um derivativo cromogênico da caseína que é utilizado amplamente como substrato enzimático, sendo obtido em uma forma altamente purificada e de baixo custo. Esse material é adequado para a detecção de atividade proteásica geral (BEYNON & BOND, 1989).

A detecção da atividade proteolítica é conveniente com esse substrato cromogênico, pois ela depende da solubilidade de peptídios coloridos de baixo peso molecular no sobrenadante após a precipitação de fragmentos maiores de azocaseína. Como os azopeptídeos possuem uma absorbância máxima, medidas de razoável precisão são obtidas com um espectrofotômetro. Além disso, o uso de tubos de microcentrífugas como recipiente de reação torna possível o processamento de grande número de amostras simultaneamente.

Misturou-se 50-100 µl de extrato bruto de levedura a 650-600 µl de tampão fosfato e 100 µl de solução de azocaseína (A-Cas da marca Sigma/Sigma Chemical Co. St. Louis USA) 2%, nessa ordem. Incubou-se durante 1h a 37°C. Adicionou-se 800 µl de ácido tricloro acético (TCA da marca Merck/Germany) 5%. Centrifugou-se (4000rpm/5min) e leu-se absorbância do sobrenadante a 336 nm (lâmpada deutério) em um espectrofotômetro (Ultrospec III, Pharmacie LKB). Leu-se contra branco preparado na seguinte ordem: TCA, azocaseína, tampão fosfato e extrato bruto de leveduras.

O cálculo é:

$$\frac{\text{Absorbância amostra} - \text{Absorbância branco}}{\text{Volume da amostra}} = \text{U/ml h}$$

Uma unidade de atividade proteásica é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir uma mudança de absorbância de 1,0 em uma cubeta de 1cm sob as condições do ensaio.

3.7.2 Análise da proteína solúvel (SCOPES, 1994)

Preparou-se a solução de albumina bovina (BSA, da marca Sigma/Sigma Chemical Co., St. Louis/USA): diluiu-se 0,02g de BSA em 100 ml de hidróxido de sódio (da marca LabSynth Ltda; SP/Brasil) 1 mM. Preparou-se a solução A: 0,25g de sulfato de cobre pentahidratado (da marca Reagen/Quimibrás Indústrias Químicas S.A.; RJ/Brasil) e 0,5g de citrato de sódio em 50 ml de água destilada. Preparou-se a solução B: 2g de hidróxido de sódio e 10g carbonato de sódio (da marca LabSynth Ltda; SP/Brasil) em 500 ml de água. Preparou-se a solução C (51 ml): 1 ml de solução A e 50 ml de solução B. Preparou-se a solução D: solução de Folin-Ciocalteu (da marca Merck/ Germany) 2N mais água destilada (1:1). Determinou-se a curva padrão adicionando-se em 6 tubos de ensaio os seguintes reagentes:

Nº do tubo:	0	1	2	3	4	5
Sol. BSA:	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
H2O	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
Sol C	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Misturou-se os reagentes e incubou-se por 5 a 10 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 0,25 ml de solução D com rápida agitação. Incubou-se por mais 20 minutos em temperatura ambiente. Leu-se a absorvância em um comprimento de onda de 750 nm. A partir da curva padrão (Figura 5), estabeleceu-se a seguinte equação que relaciona a concentração de proteína solúvel da amostra em $\mu\text{g/ml}$:

$$x = (y - 3,1 \cdot 10^{-2}) / 3 \cdot 10^{-3}$$

onde:

x = concentração da amostra

y = absorvância em 750 nm

Determinou-se a proteína solúvel dos sobrenadantes obtidos nos ensaios procedendo-se da mesma forma como para a curva padrão. Utilizou-se um volume de amostra (0 a 0,5ml) que possua uma quantidade de proteína solúvel que esteja dentro dos limites da curva (0-200 $\mu\text{g/ml}$).

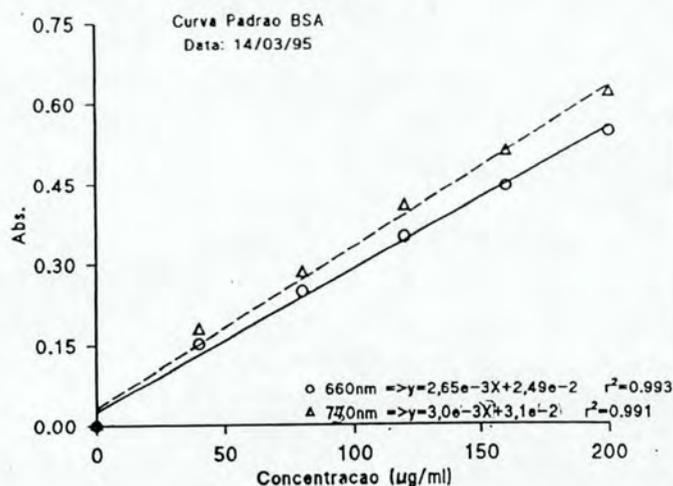


FIGURA 5. Curva padrão BSA.

3.8 Métodos de análise estatística dos resultados

3.8.1 Análise da variância

Esta técnica constitui-se num dos métodos ,geralmente, empregados na interpretação dos dados experimentais quantitativos (MARKUS, 1968).

A análise da variância é, essencialmente, um processo aritmético para decompor a variação total entre as unidades experimentais, mais corretamente, a soma dos quadrados totais, em componentes associados a fontes ou causas previstas ou identificáveis de variação.

A hipótese de nulidade referente aos tratamentos em comparação é testada por um F-teste. A estatística F é dada pela comparação de duas variâncias ou quadrados médios. Na execução do teste, o F calculado é comparado com o dado na distribuição teórica de F.

3.8.2 Teste de Duncan

Na análise da variância, quando a diferença entre as médias dos tratamentos não é significativa, nenhum teste adicional é necessário. Quando a diferença entre as médias dos tratamentos é declarada significativa pelo F-teste, isto não implica, contudo que todos os tratamentos diferem uns dos outros. Para determinar quais os tratamentos que diferem estatisticamente, novos testes são necessários. Em geral há interesse em destacar o "melhor tratamento".

Um dos testes indicados para verificar a significância estatística da diferença entre médias é o Teste de Duncan.

As médias dos resultados acompanhadas de letras diferentes diferem ao nível de significância de 5% para o teste de Duncan.

3.9 Classificação dos ensaios

3.9.1 Ensaios para determinar a eficiência de métodos de ruptura e permeabilização do envelope de células de leveduras

O congelamento das células pode facilitar a ruptura da parede celular, quando as células são submetidas a forças de atrito. Nesse caso, é interessante comparar diferentes temperaturas de tratamento da biomassa celular antes do tratamento indutor da ruptura celular.

Utilizou-se um período de tratamento das amostras de 24 horas nas temperaturas de - 5°C e 30°C.

As células são maturadas em tampão fosfato pH 7,0.

Os métodos de indução da ruptura e de permeabilização da parede celular são os descritos no Item 3.5.

A análise enzimática do extrato de leveduras é o indicativo da eficiência dos diferentes ensaios.

O número de repetições de cada ensaio é de 3, totalizando 20 ensaios.

Objetivos:

- Avaliar o efeito da temperatura das células sob a eficiência do processo de ruptura da parede celular;
- Comparar os métodos indutores de ruptura e permeabilização da parede celular, avaliando a eficiência de várias técnicas com possível uso industrial (sonicador, moinho coloidal, tratamento com etanol) frente a uma técnica de uso laboratorial (uso de pérolas de vidro);
- Selecionar o melhor processo de obtenção de extratos de leveduras sob as condições testadas.

3.9.2 Ensaio para determinar as condições de obtenção do extrato de leveduras

Os fatores a serem analisados são a temperatura para atuação das proteases durante um determinado período de tempo, o pH de atuação das proteases após a quebra das células e o tempo de maturação prévio das células de leveduras utilizadas.

3.9.2.1 Aproximação do tratamento térmico ideal para ativação das proteases intracelulares e do pH do sobrenadante para atuação destas

Utilizou-se um período de tratamento das amostras de 48 horas nas temperaturas de 20°, 30°, 40° e 54°C.

As células maturadas nas condições acima no tampão hidroalcoólico de pH 3,0 serão quebradas com pérolas de vidro em dois tampões diferentes: hidroalcoólico (pH 3,0) e fosfato (pH 7,0).

A análise enzimática do extrato de leveduras e o teor de proteína solúvel liberado no tampão hidroalcoólico e no sobrenadante obtido após a quebra das células são os indicativos da eficiência dos diferentes ensaios.

O número de repetições de cada ensaio é de 3, totalizando 24 ensaios.

Objetivos:

- Avaliar o efeito de um tratamento térmico na ativação das proteases intracelulares e/ou da liberação de compostos intracelulares;
- Avaliar o efeito do pH do meio na eficiência e ativação das proteases após a quebra das células;
- Selecionar o melhor processo de obtenção de extratos de levedura sob as condições testadas.

3.9.2.2 Aproximação do período de maturação ideal das células para a obtenção de um extrato de leveduras rico em proteases e compostos intracelulares

Na indústria vinícola nacional é possível a obtenção de biomassas maturadas sob diferentes períodos, pois normalmente o vinho espumante permanece sobre as células responsáveis pela segunda fermentação alcoólica sob um período de 1 a 6 meses. Conseqüentemente, é interessante avaliar o efeito do período de

maturação das células na obtenção de extratos de leveduras. Para tanto comparou-se o efeito de diferentes períodos de maturação.

Utilizou-se um período de maturação das amostras de 0, 1, 2 e 3 meses na temperatura de 20°C.

As células de leveduras foram maturadas em tampão hidroalcoólico pH 3,0 para imitar as condições industriais.

A concentração de células (peso de células / volume de tampão) foi em torno de 40 milhões de células/ml (0,3g biomassa com 75% de umidade em 100 ml) para permitir as manipulações necessárias (apesar de ser uma concentração de células bem superior à observada em condições industriais).

A adição de metabissulfito de potássio (260mg/l da marca Vetec/Química Fina Ltda; RJ/Brasil) ao tampão hidroalcoólico dá origem a liberação de anidrido sulfuroso em uma quantidade próxima à encontrada em condições industriais (150mg/l), diminuindo os riscos de eventuais contaminações.

A análise enzimática do extrato de leveduras e o teor de proteína solúvel liberado no sobrenadante obtido após a quebra das células são os parâmetros analisados nos diferentes ensaios.

O número de repetições de cada ensaio é de 3, totalizando 12 ensaios.

Objetivos:

- Avaliar o efeito do tempo de maturação das células de leveduras sobre a atividade enzimática intracelular;
- Avaliar o efeito do tempo de maturação das células de leveduras na potencialidade destas de liberar compostos nitrogenados;
- Selecionar o melhor processo de obtenção de extratos de leveduras sob as condições testadas.

3.9.3 Ensaio para determinar a eficiência da utilização de extratos de levedura na otimização do processo de maturação de vinhos espumantes

A adição de extratos de leveduras a um certo volume de células em maturação em um vinho espumante tem como objetivos aumentar o "pool" enzimático do meio, assim como a carga de compostos intracelulares de interesse nesse momento da qualificação do produto, de maneira a acelerar e incrementar o processo de autólise. A partir da adição de uma determinada porcentagem (peso seco/vol) de extratos de leveduras obtidos nas condições mais vantajosas determinadas anteriormente e acompanhando-se mensalmente a evolução quantitativa dos compostos nitrogenados e da atividade enzimática busca-se determinar o processo mais vantajoso de utilização de extratos de leveduras.

Adicionou-se às células em maturação (0,3g biomassa com 75% de umidade em 100 ml), 5% vol/vol de um extrato de leveduras obtido a partir de um pré-tratamento térmico seguido da quebra das células com pérolas de vidro de 1g de biomassa úmida em 10 ml de tampão hidroalcoólico, correspondendo a uma concentração aproximada de 25mg de biomassa seca/ml.

Os tratamentos térmicos antes da quebra das células de leveduras foram os seguintes:

a) Tratamento térmico de 40°C/48 horas: favorecendo a liberação de compostos nitrogenados;

b) Tratamento térmico de 20°C/48 horas favorecendo a ativação das proteases intracelulares.

Utilizou-se um período de maturação das amostras de 0, 1, 2 e 3 meses na temperatura de 20°C.

As células de leveduras foram maturadas em tampão hidroalcoólico de pH 3,0 para imitar as condições industriais.

Adicionou-se metabissulfito de potássio nas mesmas condições e com os mesmos objetivos descritos no item 3.9.2.2.

A análise enzimática presente no "vinho espumante" e o teor de proteína solúvel liberado no tampão hidroalcoólico e no sobrenadante obtido após a quebra das células são os indicativos da eficiência dos diferentes ensaios.

O número de repetições de cada ensaio é de 3, totalizando 27 ensaios.

Objetivos:

- Avaliar a influência do processo (tratamento térmico) de obtenção dos extratos de leveduras e do período de atuação do extrato na otimização do processo de maturação de vinhos espumantes.

- Selecionar o melhor processo de utilização de extratos de levedura sob as condições testadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio para determinar a eficiência de métodos de ruptura e permeabilização do envelope de células de leveduras

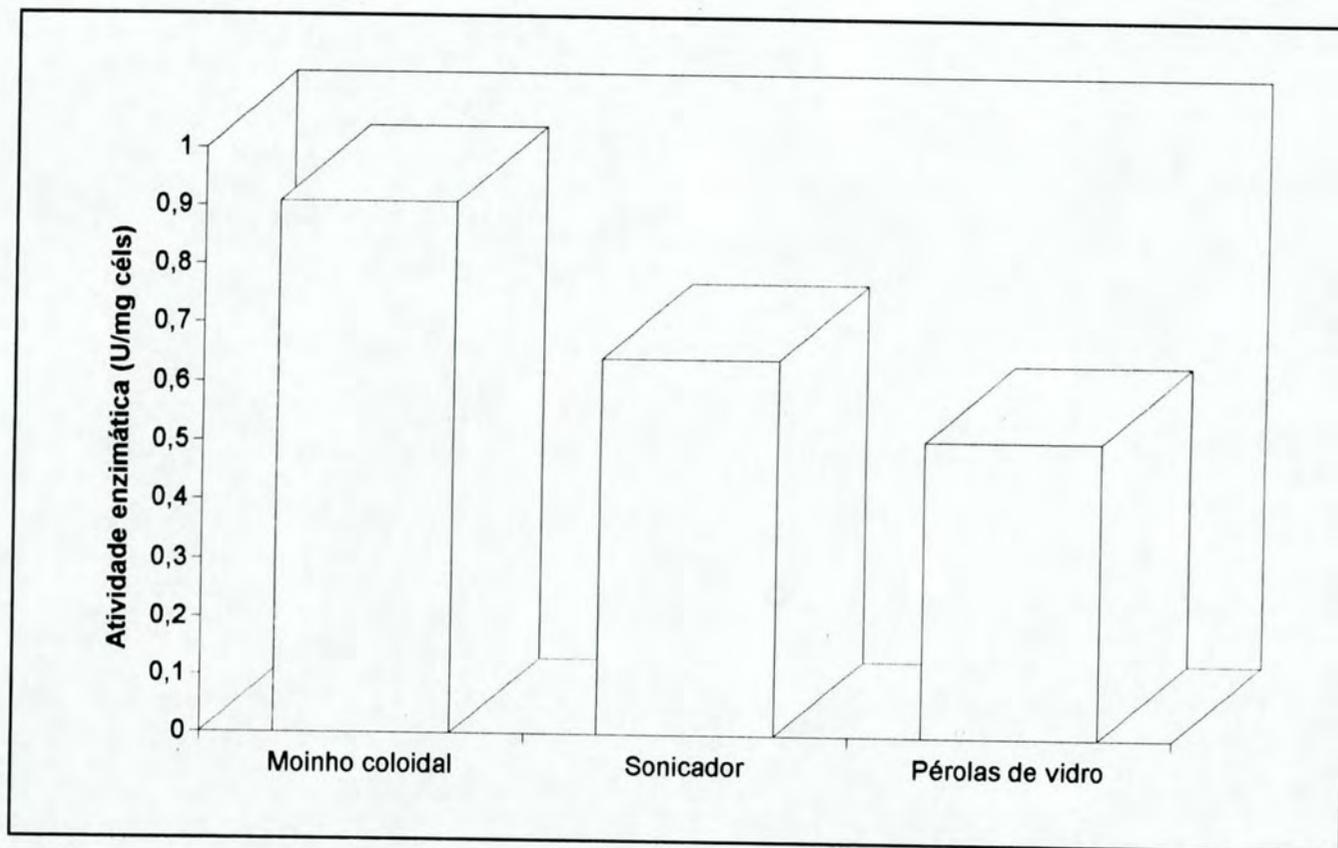


FIGURA 6: Eficiência dos métodos de ruptura e permeabilização do envelope celular de *S. cerevisiae* representada pela liberação de proteases no sobrenadante após um pré-tratamento das células à $-5^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ em tampão fosfato de pH 7,0. Os resultados representam a média de três repetições.

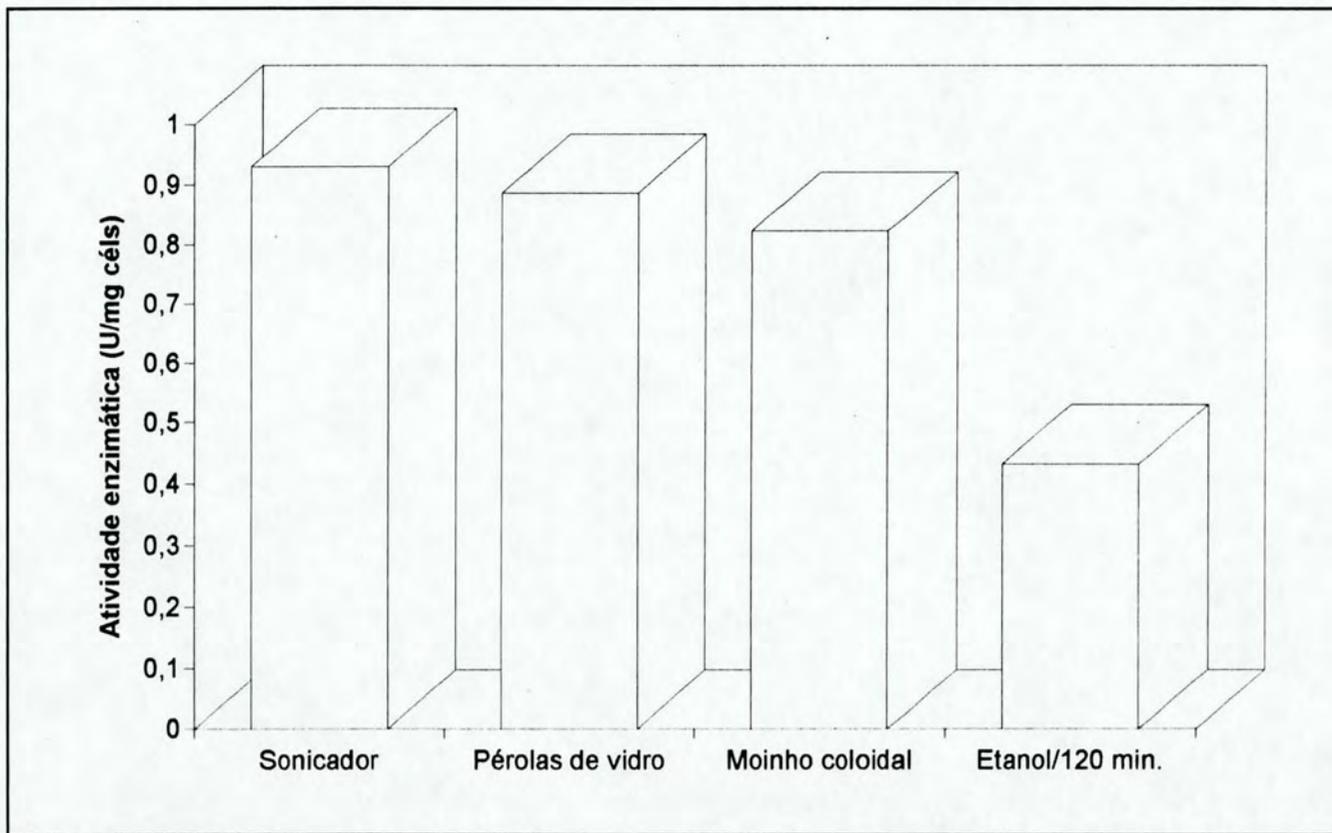


FIGURA 7: Eficiência dos métodos de ruptura e permeabilização do envelope celular de *S. cerevisiae* representada pela liberação de proteases no sobrenadante após um pré-tratamento das células à 30°C/24h em tampão fosfato de pH 7,0. Os resultados representam a média de três repetições.

4.1.1 Discussão dos resultados

Os resultados obtidos refletem não só a eficiência dos tratamentos testados na ruptura do envelope celular, mas, também, a influência do pré-tratamento térmico na ativação das proteases intracelulares.

O tratamento prévio das células à $-5^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ pareceu favorecer o tratamento que fez uso do moinho coloidal. Contudo, o tratamento prévio das células à $30^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ pareceu promover a atividade das proteases intracelulares, visto que, nos outros dois tratamentos físicos testados, os valores médios da atividade proteolítica foram, nessas condições, maiores do que os obtidos com o tratamento prévio a $-5^{\circ}\text{C} / 24\text{h}$.

Com o pré-tratamento das células à $-5^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ o moinho coloidal foi mais eficiente do que o uso de pérolas de vidro. O uso do sonicador apresentou um resultado intermediário entre os tratamentos citados, não diferindo significativamente de nenhum deles (Figura 6).

Com o pré-tratamento das células à $30^{\circ}\text{C}/24\text{h}$, observou-se que os tratamentos físicos foram mais eficientes na ruptura do envelope celular das células do que o tratamento químico de permeabilização (Figura 7). Em especial, o uso do sonicador apresentou os melhores resultados, o que pode ser devido à capacidade do fenômeno de cavitação de romper as organelas intracelulares, entre elas as vesículas que contém as proteases.

Em relação ao método de permeabilização pelo etanol, deve-se acrescentar que alguns inconvenientes podem ocorrer em relação à obtenção de extratos enzimáticos ou produtos derivados da ação enzimática intracelular. O primeiro deles é a possível ação desnaturante do solvente frente às enzimas como foi alertado por FENTON (1982), mesmo que estas permaneçam dentro dos limites celulares durante a permeabilização. O segundo inconveniente é a perda irrecuperável de compostos intracelulares liberados durante o período de permeabilização e descartados junto com o solvente, o que necessariamente não permite a obtenção de um extrato celular com a mesma riqueza de compostos dessa natureza em relação aos métodos físicos de ruptura celular.

4.2 Ensaio para determinar as condições de obtenção do extrato de leveduras

4.2.1 Aproximação do tratamento térmico ideal para ativação das proteases intracelulares e do pH do sobrenadante para atuação destas, provocando a hidrólise e liberação dos compostos intracelulares

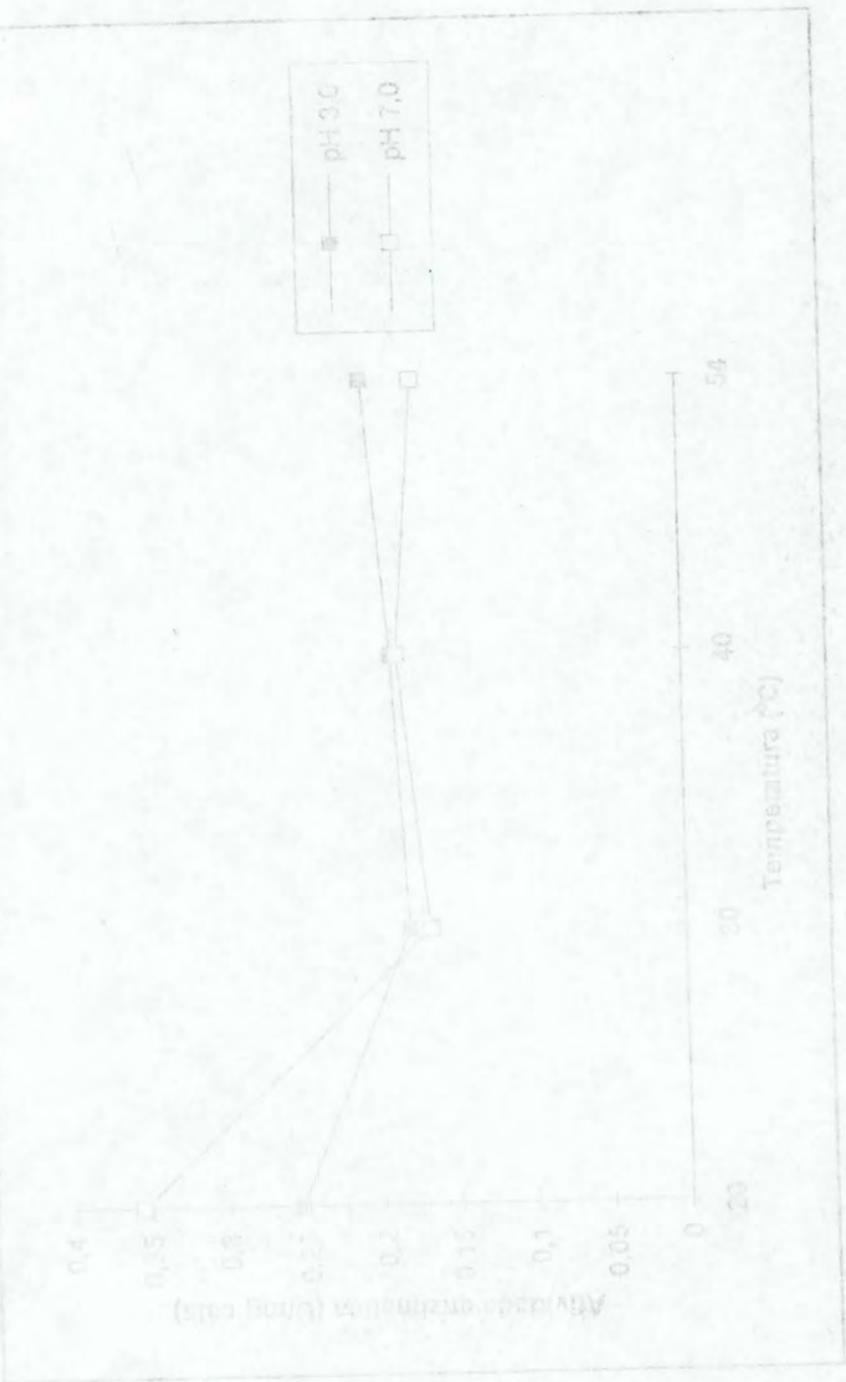


FIGURA 8: Influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (40% vol) de pH 3,0 na produção das proteínas da cultura de *S. cerevisiae*. O extrato celular foi obtido sob duas condições diferentes de pH: um em tampão fosfato de pH 7,0 e outro em tampão hidroalcoólico de pH 3,0. Os resultados apresentam a média de três repetições.

4.2.1.1 Discussão dos resultados

Esperava-se que a ruptura das células em um meio de pH 3,0 provocasse a inativação dos inibidores específicos mais rapidamente do que em um meio de pH 7,0, refletindo-se em uma atividade enzimática superior (LENNEY & DALBEC, 1967), (SAHEKI et al., 1974), (SAHEKI & HOLZER, 1975), (JONES, 1991) que é desencadeada por uma pequena quantidade de atividade "livre" da protease A (SAHEKI et al., 1974), (SAHEKI & HOLZER, 1975), (BETZ et al., 1974). Contudo, os resultados obtidos foram superiores em pH 7,0 a 20°C.

Porém, o efeito do teor alcoólico sobre a atividade enzimática não foi considerado e pode ter diminuído a ação proteásica, principalmente a atividade da protease A (SUGIMOTO, 1974).

Nos dois tampões (pH 3,0 e 7,0), a atividade enzimática intracelular foi mais intensa a 20°C do que em temperaturas superiores (Figura 8), o que confirma a ação inativadora das temperaturas superiores mantidas nos outros tratamentos durante 48 horas e que está em consonância com os resultados observados por MOLNAR et al. (1980b); FEUILLAT & CHARPENTIER (1982); FEUILLAT (1986) e NEKLYUDOV et al. (1993) citados no item 2.3.1.

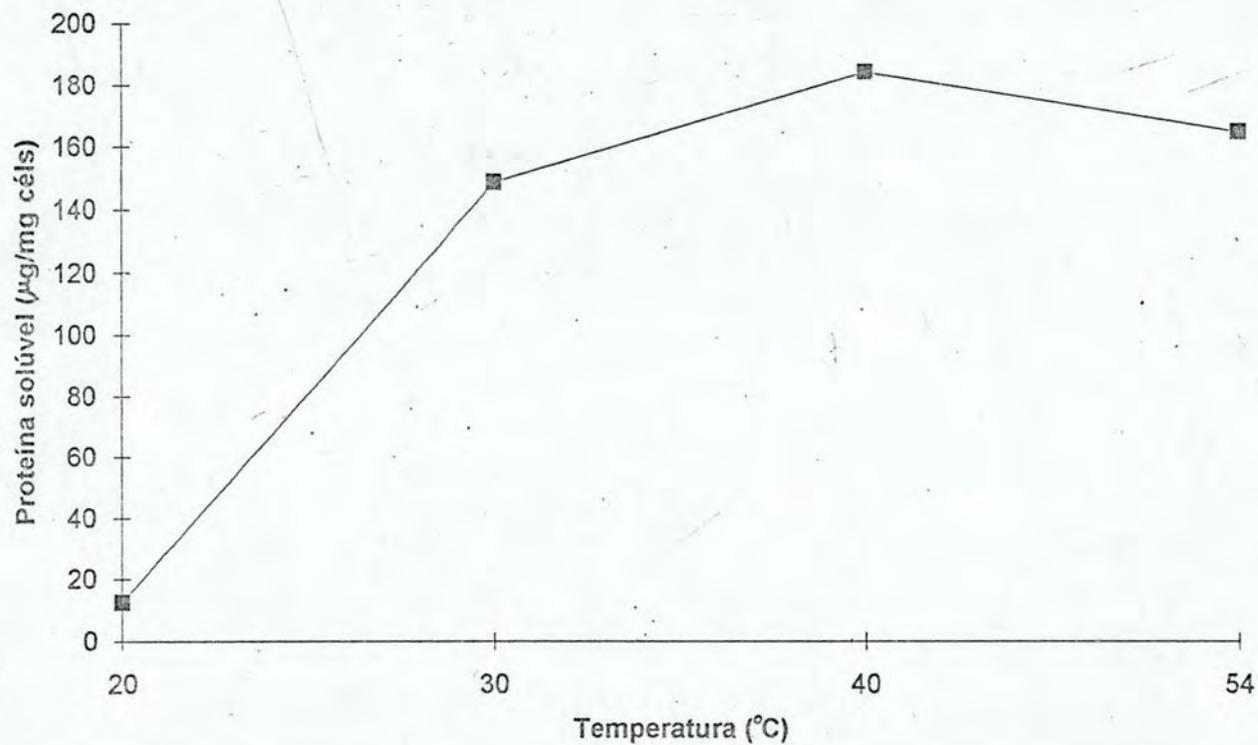


FIGURA 9: Influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10% vol) de pH 3,0 na liberação de compostos nitrogenados intracelulares de baixo peso molecular de células de *S. cerevisiae*.
Os resultados representam a média de seis repetições.

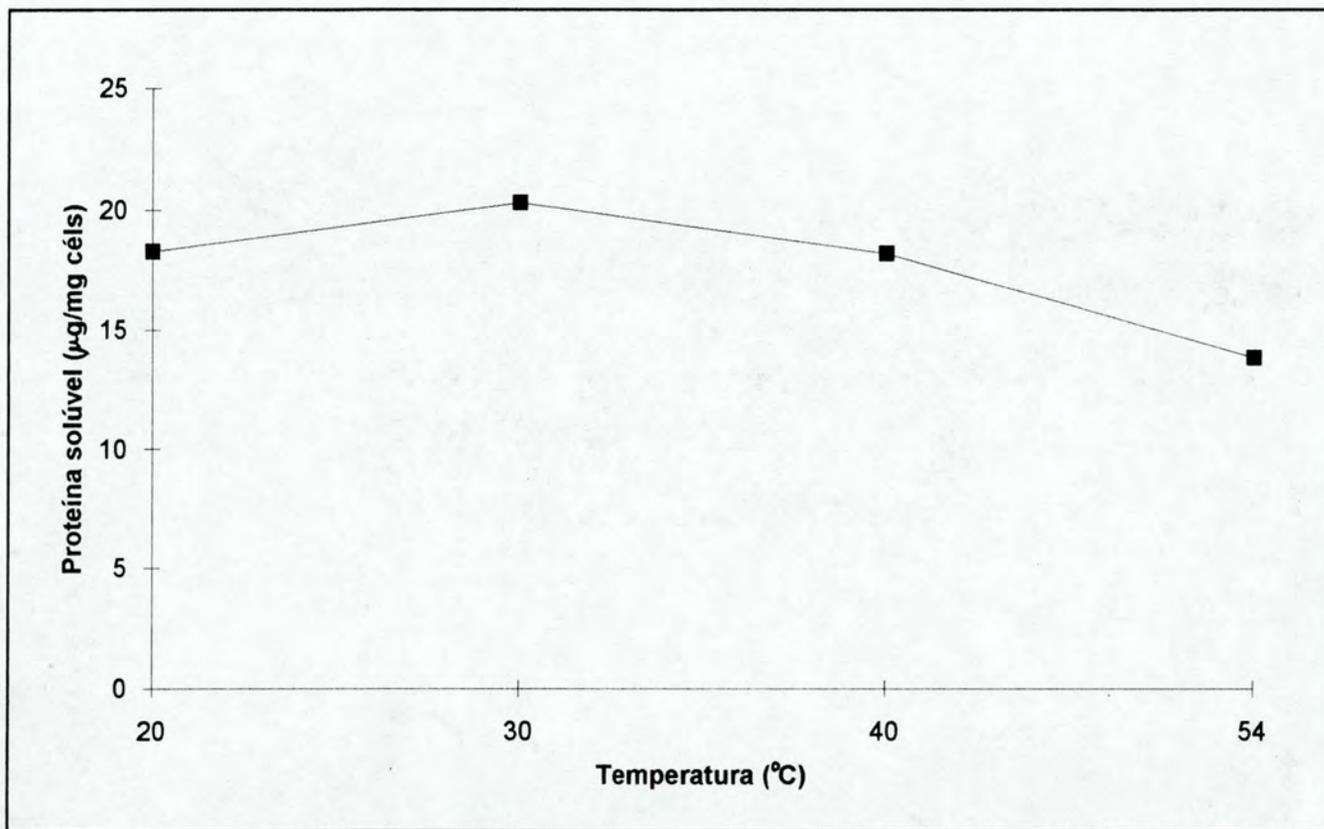


FIGURA 10 : Influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10% vol) de pH 3,0 na hidrólise de compostos nitrogenados intracelulares de células de *S. cerevisiae*.

O extrato foi obtido em tampão hidroalcoólico de pH 3,0.

Os resultados representam a média de três repetições.

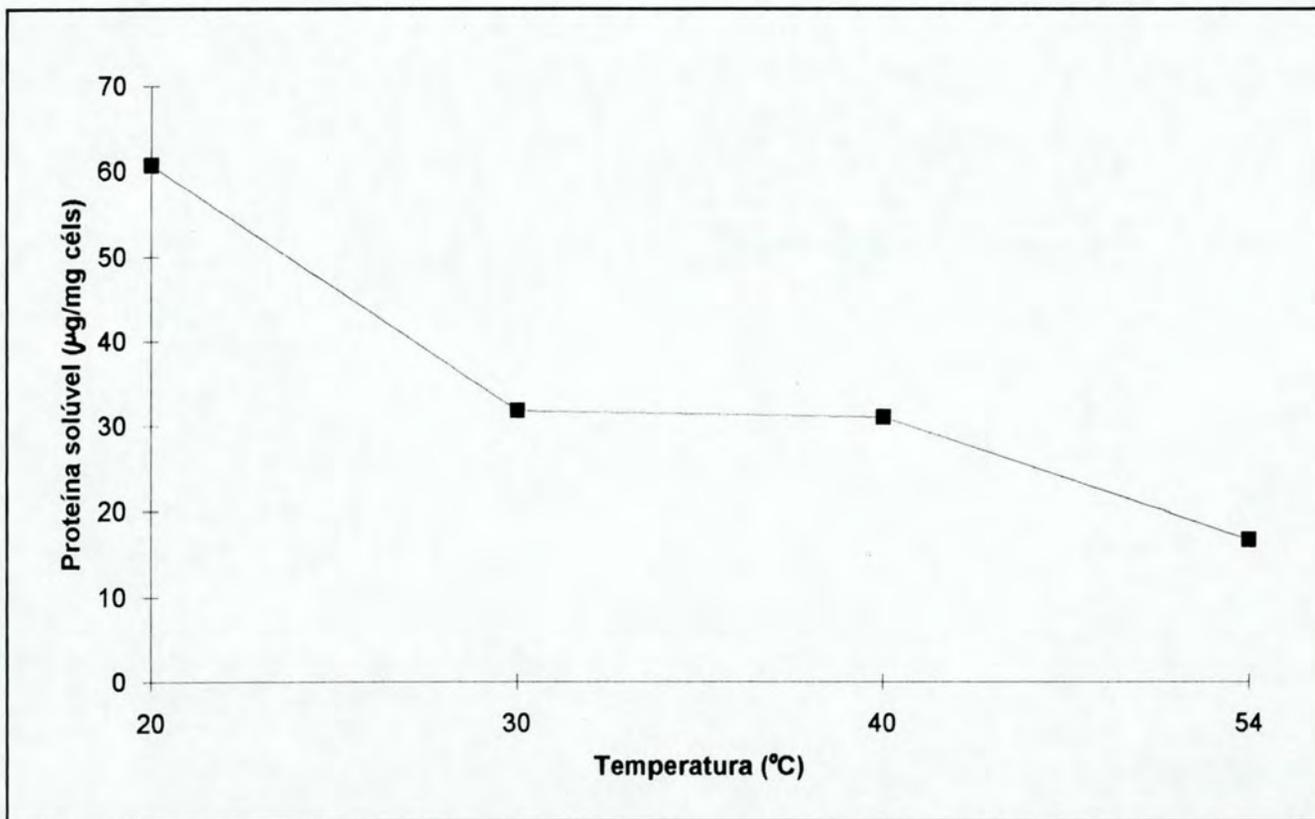


FIGURA 11 : Influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10% vol) de pH 3,0 na hidrólise de compostos nitrogenados intracelulares de células *S. cerevisiae*.
O extrato celular foi obtido em tampão fosfato de pH 7,0.
Os resultados representam a média de três repetições.

4.2.1.2 Discussão dos resultados

A liberação de compostos nitrogenados no tampão hidroalcoólico, durante o período dos tratamentos térmicos, demonstrou uma clara tendência de que as maiores faixas de temperatura provocassem uma liberação mais importante desses elementos (Figura 9) como observaram diversos autores citados no item 2.3.1. Provavelmente, devido às alterações causadas na membrana plasmática nessas condições, provocando o aumento de sua permeabilidade como descreveu BABAYAN & BEZRUKOV (1985), mas, também, por uma provável atividade proteásica intensa e breve anterior ao momento da análise, provocando uma hidrólise protéica acentuada como descreveram NEKLYUDOV et al. (1993). Nesse caso, a análise da atividade proteásica em 48 horas reflete a atividade enzimática residual.

Pode-se supor, pelos resultados dos autores citados no item 2.4.3, que a atividade glucanásica contribua positivamente na permeabilização do envelope celular das células de leveduras, especialmente na faixa de temperatura de 40°C (KITAMURA, 1982).

A análise da proteína solúvel intracelular liberada após a quebra das células demonstra que os tratamentos realizados em temperaturas mais baixas permitiram a maior liberação de compostos nitrogenados intracelulares, que não foram liberados no meio hidroalcoólico durante os tratamentos pela menor permeabilidade de membrana conseqüente a essas condições e, concomitantemente, pela preservação da atividade enzimática intracelular durante o período considerado, especialmente à 20°C (Figuras 10 e 11).

A ruptura das células de leveduras em um meio de pH 7,0 apresentou resultados superiores no teor de proteína solúvel liberada no sobrenadante principalmente a 20°C, o que pode ser consequência da maior atividade enzimática observada nessas condições (Figura 8).

Comparando-se a liberação de compostos nitrogenados antes e após a ruptura do envelope celular, é possível concluir que, pelo menos para esses componentes, nas maiores faixas de temperatura a quebra do envelope celular não é necessária para se obter um bom rendimento do processo.

4.2.2 Aproximação do período ideal de maturação das células para a obtenção de um extrato de leveduras rico em proteases e compostos intracelulares

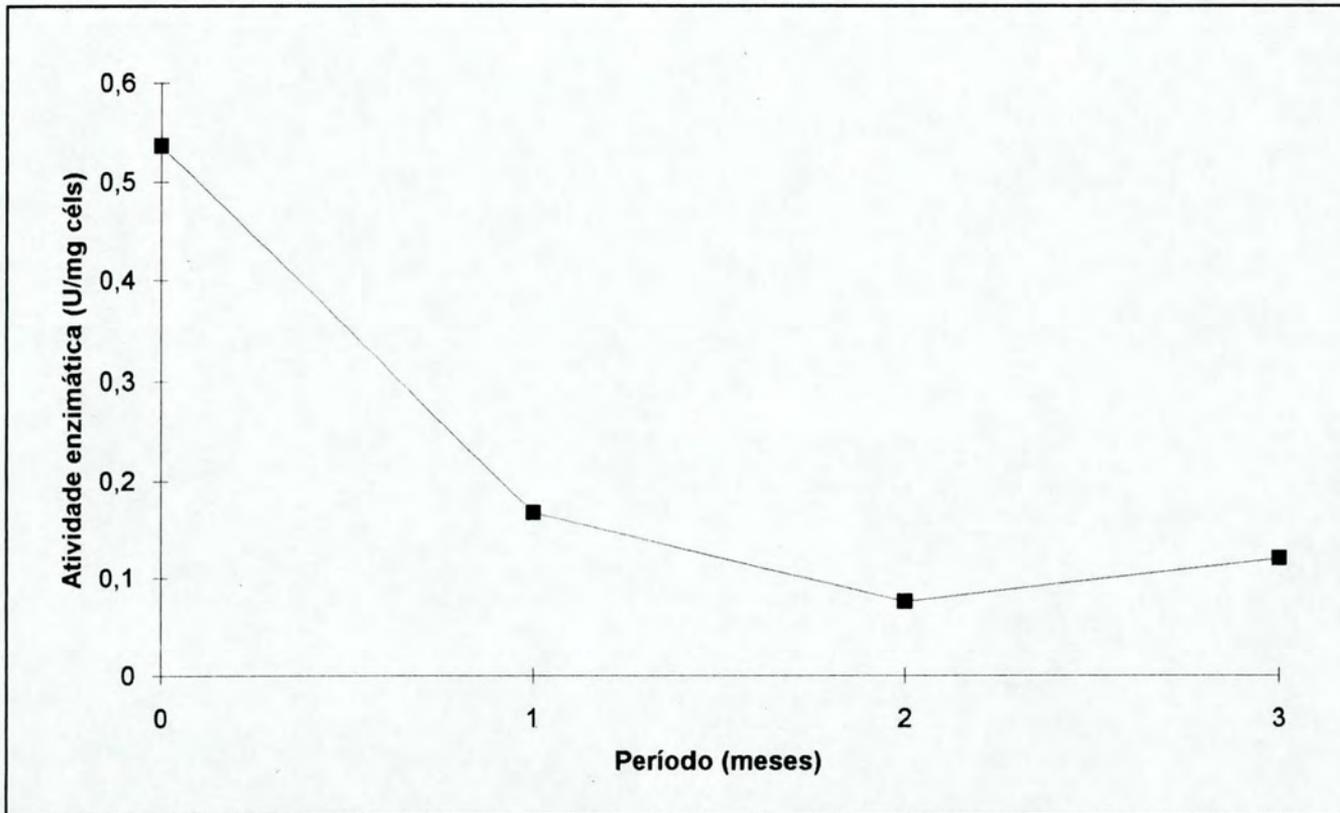


FIGURA 12 : Evolução da atividade proteásica intracelular em função do tempo de maturação das células de *S. cerevisiae* no "vinho espumante".
Os resultados representam a média de três repetições.

4.2.2.1 Discussão dos resultados

A evolução da atividade proteásica intracelular nas células de leveduras maturadas em tampão hidroalcoólico de pH 3,0 parece-se com aquela descrita por LEROY et al. (1990): existe uma máxima atividade proteásica logo no início do período de maturação do vinho espumante que diminuí a um nível bem inferior no primeiro mês, mínimo no segundo e inicia uma lenta recuperação a partir do terceiro mês de maturação (Figura 12). Contudo, segundo a Figura 2, a atividade proteásica intracelular nos meses subseqüentes jamais atinge os níveis iniciais.

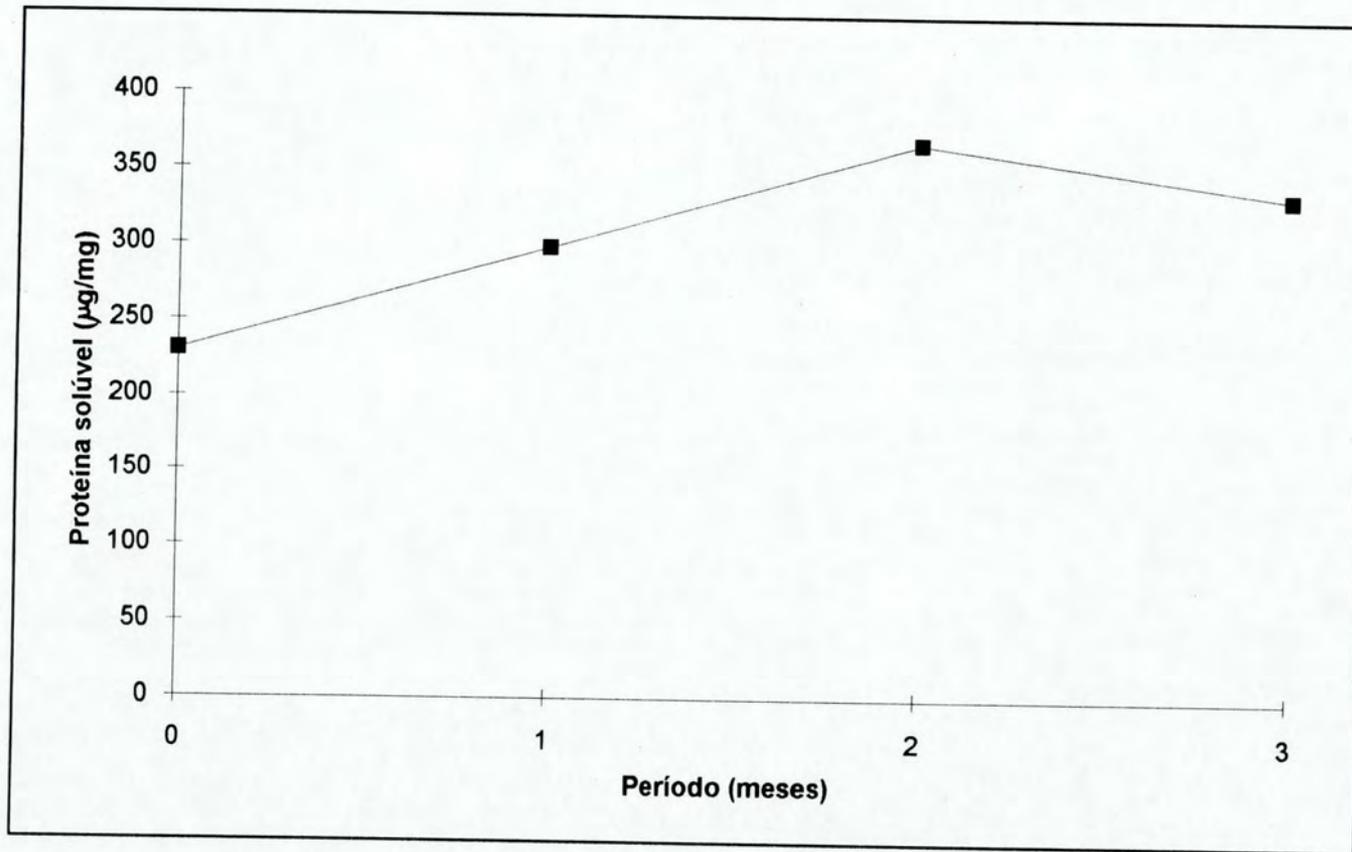


FIGURA 13 : Evolução da concentração de compostos nitrogenados de baixo peso molecular no "vinho espumante" em função do tempo de maturação das células de *S. cerevisiae*. Os resultados representam a média de três repetições.

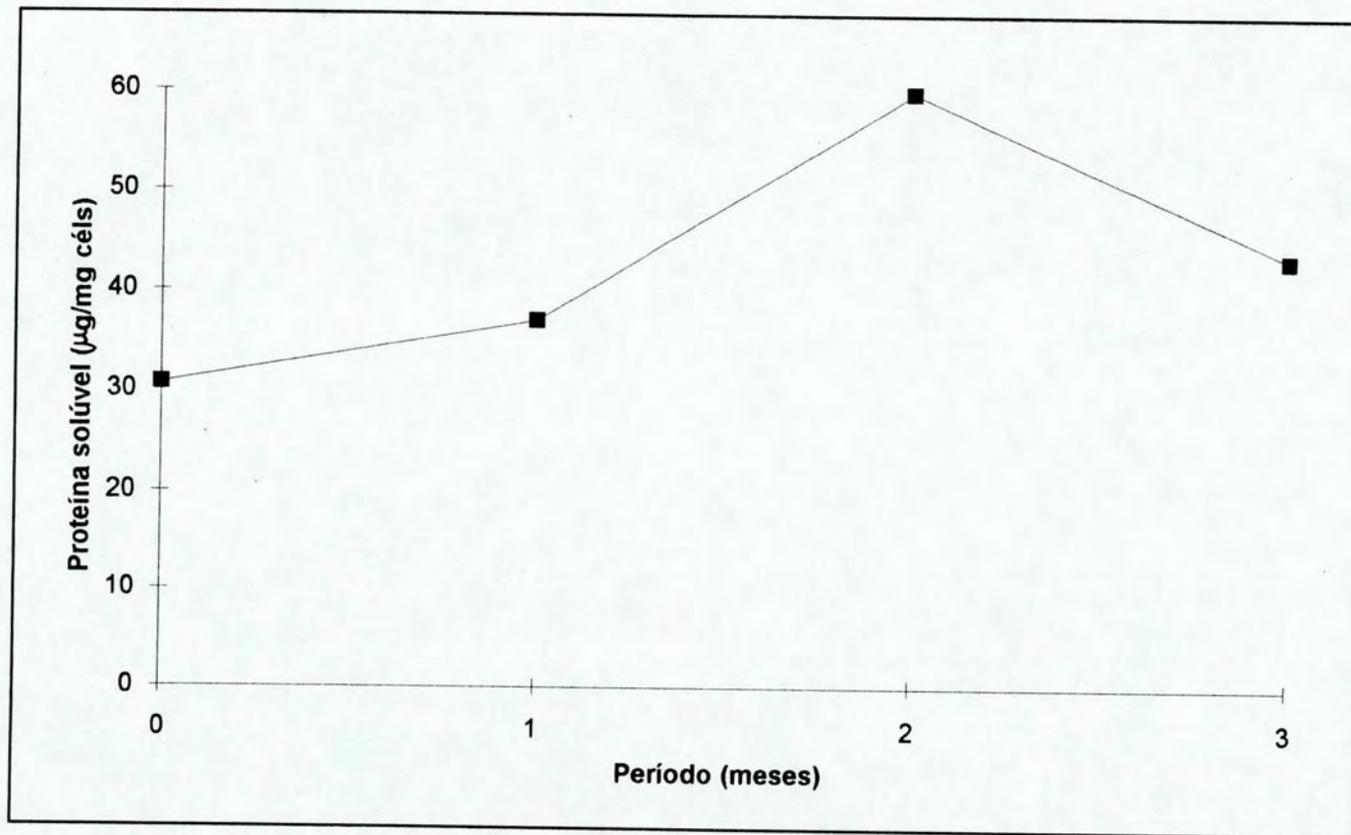


FIGURA 14 : Evolução da concentração de compostos nitrogenados intracelulares de baixo peso molecular em função do tempo de maturação das células de *S. cerevisiae* no "vinho espumante". Os resultados representam a média de três repetições.

4.2.2.2 Discussão dos resultados

A evolução dos compostos nitrogenados solúveis intracelulares e dos compostos nitrogenados liberados no "vinho espumante" define-se por curvas de perfil semelhante (Figuras 13 e 14).

A proteína solúvel no "vinho espumante" aumenta, gradativamente, do início do período de maturação até o segundo mês de contato com a biomassa para diminuir um pouco somente no terceiro mês (Figura 13).

A proteína solúvel intracelular descreve uma evolução semelhante à descrita acima, contudo o pico atingido no terceiro mês é melhor definido (Figura 14).

É interessante notar que a evolução dos compostos nitrogenados solúveis é inversa àquela que se poderia esperar em função da atividade proteásica intracelular: a máxima atividade enzimática ocorre no início do período de maturação e nesse momento a proteína solúvel intra e extra celular é mínima. Pode-se explicar este fato, pois a hidrólise proteica intracelular ocorre, provavelmente, de maneira mais intensa no início do período de maturação, mas a liberação desses compostos de baixo peso molecular é gradual e, possivelmente, de acordo com o aumento da permeabilidade do envelope celular das células de leveduras como descreveram PITON et al. (1988).

4.3. Ensaio para determinar a eficiência da utilização de extratos de leveduras na otimização do processo de maturação de vinhos espumantes

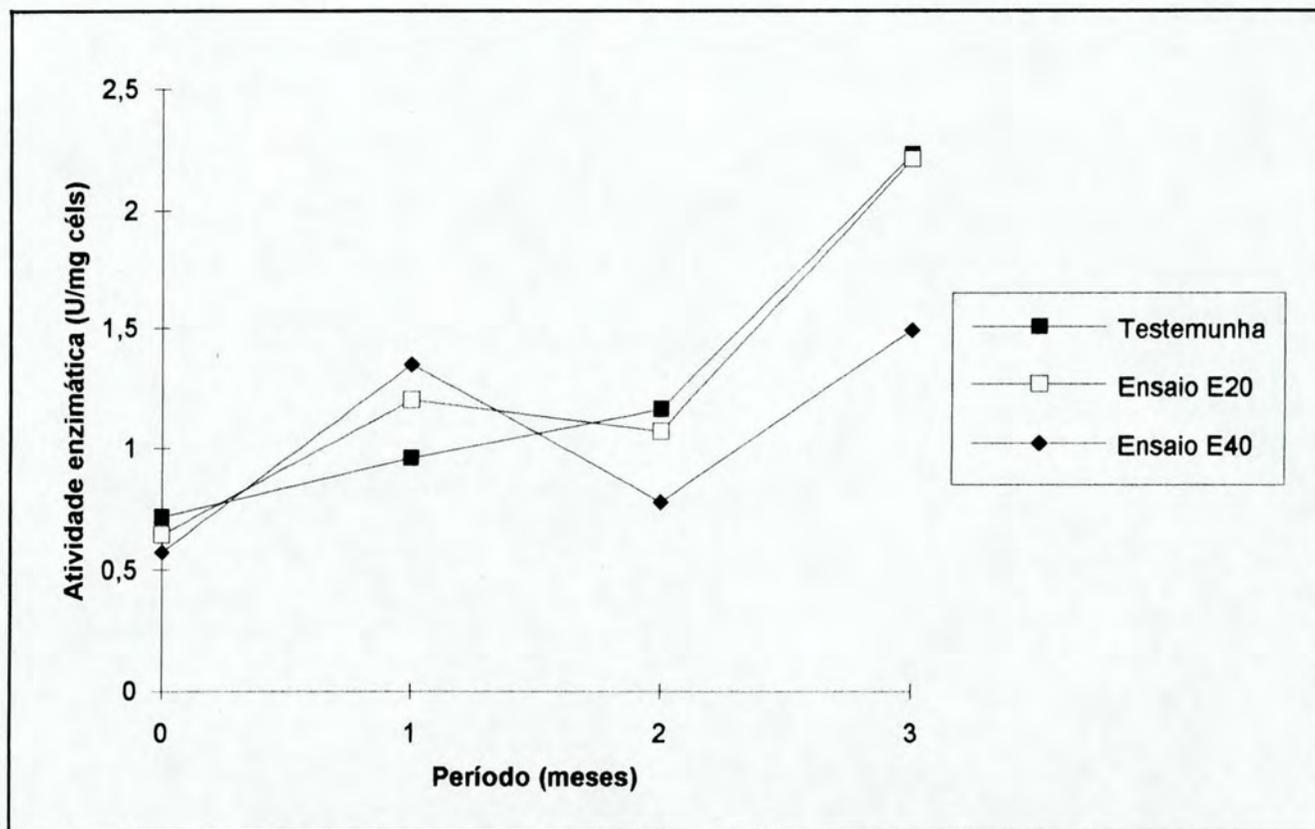


FIGURA 15 : Evolução da atividade proteásica no "vinho espumante" em função do tempo de maturação das células de *S. cerevisiae* e dos tratamentos.

E20 : Adição de 5% em volume de um extrato de leveduras (0,025 g / ml) obtido com um pré-tratamento à 20 C / 48h.

E40 : Adição de 5% em volume de um extrato de leveduras (0,025 g / ml) obtido com um pré-tratamento à 40 C / 48h.

Os resultados representam a média de três repetições.

4.3.1 Discussão dos resultados

A evolução da atividade proteásica no "vinho espumante" da testemunha e do ensaio com a adição do extrato celular obtido com um pré-tratamento de 20°C/48h (E20) são semelhantes e descrevem uma curva que aumenta lentamente entre o início do experimento e o segundo mês de maturação e apresenta um máximo no terceiro mês do experimento (Figura 15). Esse resultado demonstra que no período coberto pelo experimento não ocorre um incremento de atividade proteásica no "vinho espumante" conseqüente a adição de um extrato rico enzimaticamente (E20).

A evolução da atividade proteásica no "vinho espumante" adicionado com o extrato celular obtido com um pré-tratamento de 40°C/48 h (E40) é errática e, a partir do segundo mês de maturação do vinho espumante, é sempre inferior à atividade observada nos outros tratamentos (Figura 15). Essa observação talvez encontre explicação na ação inibitória de peptídios e aminoácidos específicos presentes em maior concentração no extrato E40 como obsevaram NEKLYUDOV et al. (1994).

Apesar das observações acima, a média dos tratamentos do experimento não diferiram significativamente em nenhum período considerado e o coeficiente de variação dos experimentos foi elevado.

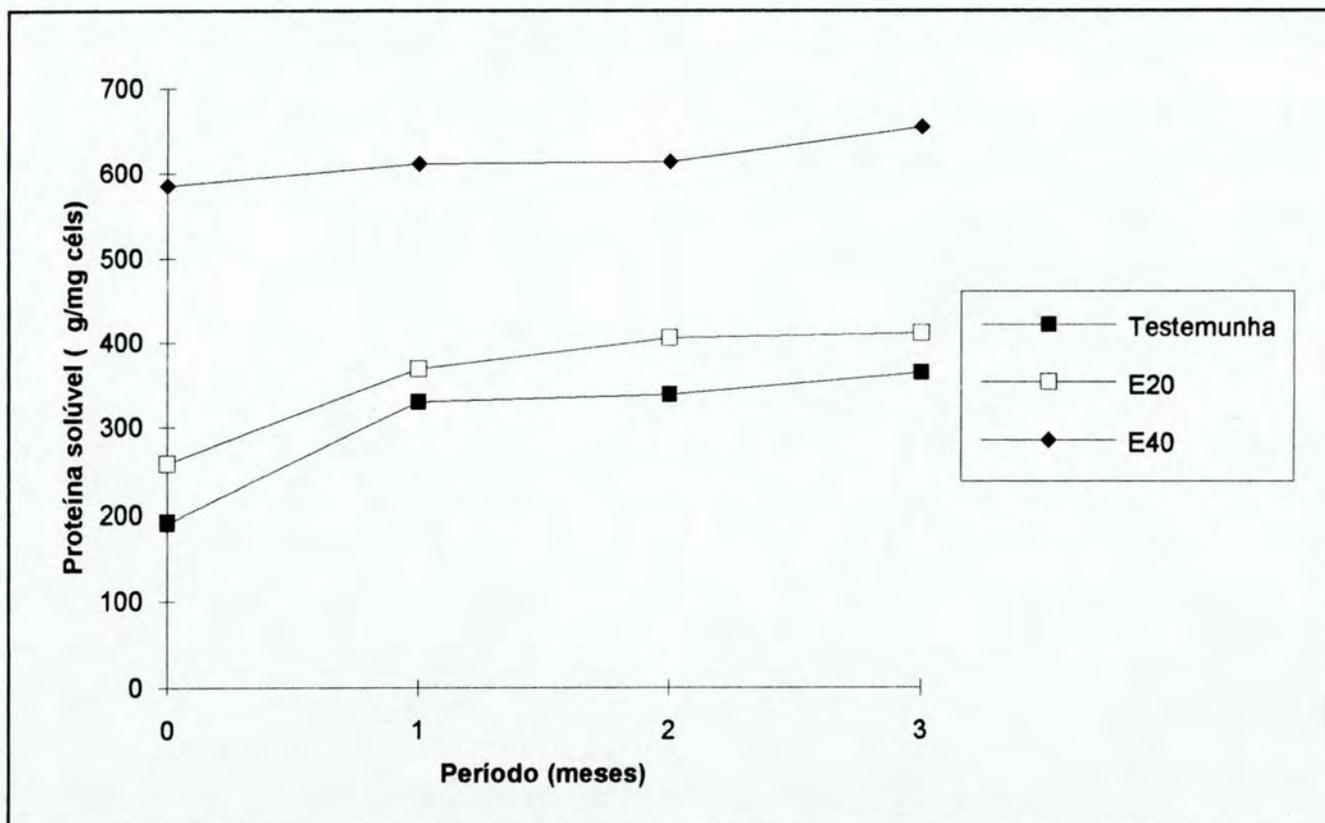


FIGURA 16 : Evolução da concentração de compostos nitrogenados de baixo peso molecular no "vinho espumante" em função do tempo de maturação das células de *S. cerevisiae* e dos tratamentos. E20: Adição de 5% em volume de um extrato de leveduras (0,025 g / ml) obtido com um pré-tratamento à 20 C / 48h. E40: Adição de 5% em volume de um extrato de leveduras (0,025 g / ml) obtido com um pré-tratamento à 40 C / 48h. Os resultados representam a média de três repetições.

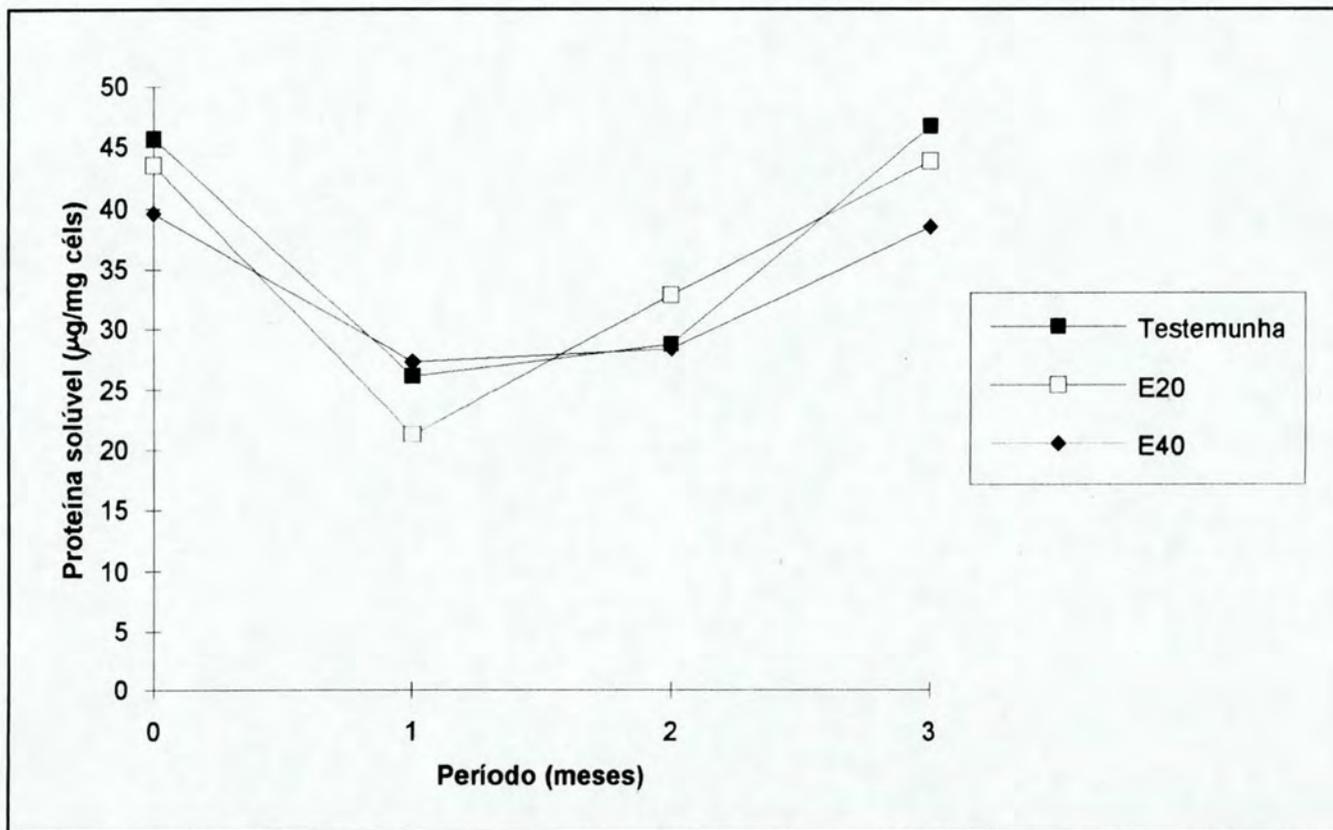


FIGURA 17: Evolução da concentração de compostos nitrogenados intracelulares de baixo peso molecular em função do tempo de maturação das células de *S. cerevisiae* e dos tratamentos.

E20: Adição de 5% em volume de um extrato de leveduras (0,025 g / ml) obtido com um pré-tratamento à 20°C / 48h.

E40: Adição de 5% em volume de um extrato de leveduras (0,025 g / ml) obtido com um pré-tratamento à 40°C / 48h.

Os resultados representam a média de três repetições.

4.3.2 Discussão dos resultados

A adição de extratos de leveduras ao "vinho espumante" provocou um enriquecimento importante em compostos nitrogenados de baixo peso molecular, em especial quando se utilizou o extrato rico nesses elementos (E40).

As diferenças entre os teores de proteína solúvel nos diferentes tratamentos mantêm-se relativamente constantes durante todo o período do experimento (Figura 16) como descreveu FEUILLAT (1986).

A evolução da proteína solúvel nos diversos tratamentos descreve uma lenta ascendente provocada pela liberação de compostos nitrogenados de baixo peso molecular das células em maturação e/ou pela atividade proteásica intra e extracelular.

A adição de extratos de leveduras não provocou um aumento da taxa de autólise das células de leveduras em maturação (que se traduziria por um aumento importante da proteína solúvel com o passar do tempo), contrariando as observações de KOLLAR et al. (1991).

Em relação aos compostos nitrogenados intracelulares de baixo peso molecular, observa-se uma evolução equivalente dos três tratamentos no período do experimento: os teores intracelulares sofrem uma depressão no primeiro e segundo mês do experimento para aumentar no terceiro mês até atingir teores equivalentes ao início do experimento (Figura 17).

5. CONCLUSÕES

5.1 Seleção do método de ruptura do envelope celular de células de *Saccharomyces cerevisiae*

O uso do sonicador nas condições descritas nos ensaios demonstrou ser o método mais eficiente e econômico (visto que não necessita de um resfriamento prévio da biomassa) para a obtenção de extratos celulares.

5.2 Seleção do método de obtenção do extrato de leveduras

Um pré-tratamento das células na faixa de temperatura em torno de 40°C durante 48 horas permite uma máxima liberação de compostos nitrogenados de baixo peso molecular, tanto pela ativação proteásica intracelular como pelo aumento da permeabilidade da membrana plasmática da célula. Pode-se inferir, que nessas condições, ocorra a máxima liberação de outros compostos de interesse qualitativo para elaboração de vinhos espumantes (glicoproteínas, sacarídeos, enzimas). Por outro lado, o pré-tratamento da biomassa na temperatura de 40°C/48h resulta na obtenção de um extrato celular com baixa atividade proteásica residual.

O pré-tratamento das células a 20°C/48h permite a obtenção de um extrato celular com teores de proteína solúvel muito inferiores, mas com uma atividade residual importante.

Nesse caso, a questão que se coloca é se a atividade enzimática no extrato E20 terá uma ação hidrolítica sobre a biomassa disponível em um vinho espumante em maturação, suficientemente importante, para num período de alguns meses provocar o enriquecimento do vinho espumante em compostos intracelulares de potencial qualitativo em níveis próximos aos obtidos com a utilização do extrato E40.

É interessante que o pré-tratamento das células ocorra no próprio vinho de maneira a recuperar, integralmente, os compostos intracelulares liberados antes e após o tratamento de ruptura do envelope celular. Em seguida, a realização de uma filtração permite a obtenção de um extrato de leveduras livre das cascas que poderiam influir negativamente nas características organolépticas do produto como descreveu FEUILLAT (1986).

Além disso, a utilização de células de leveduras com aproximadamente dois meses de maturação no vinho espumante parece permitir a obtenção de extratos mais ricos em compostos intracelulares pelo nível de hidrólise alcançado nessa etapa. Contudo, se o objetivo é obter um extrato celular rico em proteases, a utilização de células de leveduras com o menor período possível de maturação sobre os vinhos espumantes parece ser o ideal.

5.3 Seleção do método de utilização de extratos de leveduras na otimização do processo de maturação de vinhos espumantes

Pelos resultados obtidos no experimento de adição de extratos de leveduras, torna-se evidente que a adição de um extrato celular rico em atividade proteásica residual (E20) não permite um enriquecimento do "vinho espumante" em compostos nitrogenados de baixo peso molecular e, provavelmente, também de compostos intracelulares de potencial qualitativo, tão importante quando da adição de um extrato rico em compostos nitrogenados intracelulares de baixo peso molecular obtido a partir de um pré-tratamento térmico (E40), mesmo que nesse caso a atividade proteásica residual do extrato seja muito menor.

6. PERSPECTIVAS

Algumas questões complementares, não abordadas por esse estudo, deveriam ser aprofundadas no interesse de precisar as condições de obtenção e utilização de extratos de leveduras com o objetivo de ampliar os possíveis benefícios desta opção tecnológica na qualificação de vinhos espumantes.

a) Selecionar cepas de leveduras com maior capacidade autolítica, objetivando sua utilização tanto no incremento do processo de maturação como na obtenção de extratos celulares ricos em compostos intracelulares.

b) Comparar a atividade proteásica intracelular e a potencialidade de liberação de compostos intracelulares de potencial qualitativo de células maturadas no vinho e de células liofilizadas simplesmente reidratadas.

c) Estudar o efeito do uso de extratos de leveduras na segunda fermentação alcoólica na qualificação do produto como descreveram CIOLFI et al. (1990).

d) Estudar o processo de obtenção de extratos de leveduras ricos em elementos enaltecendores do gosto e aroma como os 5'-nucleotídeos e sua importância na qualificação de vinhos espumantes.

e) Desenvolver um processo de obtenção de extratos de leveduras, com uma alta concentração de elementos intracelulares de potencial qualitativo e com uma baixa umidade, através de aparelhos do tipo "spray dryer", que permita a estocagem do produto a baixa temperatura.

f) Quantificar em todos os processos e produtos desenvolvidos os elementos de potencial interesse qualitativo (glicoproteínas, aminoácidos, 5'-nucleotídeos, ácidos graxos, dimetilsulfito, ésteres sintetases) e seus produtos, de maneira a melhor monitorar os benefícios dos processos adotados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-EL-AL, A. T. H. ; PHAFF, H. J. 1969. Purification and properties of endo-b-glucanase in the yeast *Hanseniaspora valbyensis*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 15, p. 679-701.
- ACHSTETTER, T. ; WOLF, D. H. 1985. Proteinases, proteolysis and biological control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Chichester, v. 1, p. 139-157.
- ARNOLD, W. N. 1972. The structure of the yeast cell wall. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 247, p. 1161-1169.
- BABAYAN, T. L. ; BEZRUKOV, M.G. 1985. Autolysis in yeasts. **Acta Biotechnologica**, Berlin v. 5, p. 129-136.
- BACON, J. S. D. ; GORDON, A. H. ; JONES, D. ; TAYLOR I. F. ; WEBLEY, D. M. 1970. The separation of b-glucanases produced by *Cytophaga johnsonii* and their role in the lysis of yeast cell walls. **Biochemical Journal**, London, v. 120. p. 67-78.
- BECK, I. ; FINK, G. R. ; WOLF, D. H. 1980. The intracellular proteinases and their inhibitors in yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 255, p. 4821-4828.
- BÉHALOVÁ, B. ; BERAN, K. 1979. Activation of proteolytic enzymes during autolysis of disintegrated baker's yeast. **Folia Microbiologica**, London, v. 24, p. 455-461.
- BÉHALOVÁ, B. ; BLÁHOVÁ, M. ; SILLINGER, V. ; MACHEK, F. 1991. Comparison of various ways of extraction of nucleic acids and of preparation of yeast extract from *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*. **Acta Biotechnologica**, Berlin, v. 11, p. 547-552.

BETZ, H. ; HINZE, H. ; HOLZER, H. 1974. Isolation and properties of two inhibitors of proteinase B from yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 249, p. 4515-4521.

BETZ, H. 1979. Loss of sporulation ability in a yeast mutant with low proteinase A levels. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 100, p. 171-174.

BEVERS, J. ; VERACHTERT, H. 1976. Synthesis of higher alcohols in the genus *Zymomonas*. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 82, p. 35-40.

BEYNON, R. J. ; BOND, J. S. 1989. **Proteolytic enzymes, a practical approach**. Oxford, IRL Press. 259 p. (Practical Approach Series).

BIDAN, P.; FEUILLAT, M. ; MOULIN, J.Ph. 1985 Les vins mousseux. In: ASSEMBLEE GENERALE DE L'O.I.V, 65. Paris, 1985. [**Anales ...**] Paris, l'O. I. V. , p. 1-53, (Comission II : Oenologie).

BILINSKI, C. A. ; EMERY, C. J. ; ZYGORA, P. S. ; RUSSELL, I. ; STEWART, G. G. 1988. Application of extracellular yeast proteinases in beer stabilization. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, Cleveland, v. 8, p. 111-120.

BREDDAM, K. ; BEENFELDT, T. 1991. Acceleration of yeast autolysis by chemical methods for production of intracellular enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 35, p. 323-329.

CAMPBELL, I. ; DUFFUS, J. H. 1988. **Yeast, a practical approach**. Oxford, IRL Press. 289 p. (Practical Approach Series).

CHAMBERLAIN, H. E. 1989. Production of organoleptic compounds by distillers' yeast in continuous culture. **Dissertation Abstracts International**, Ann Arbor, v. 49, p. 2489-2490.

CHARPENTIER, C. ; NGUYEN VAN LONG, T. ; BONALY, R. ; FEUILLAT, M. 1986. Alteration of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during autolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 24, p. 405-413.

CIOLFI, G. ; GAROFOLO, A. ; MORASSUT, M. ; TONET, A. L. 1990. Fattori condizionanti il metabolismo del lievito. **Vini d'Italia**, Roma, v. 32, p. 9-25.

- COLAGRANDE, O. ; SILVA, A. 1981a. Aspects qualitatifs et technologiques de l'application des méthodes thermiques dans la production des vins mousseux. **Connaissance de la Vigne et du Vin**, Talence, v. 15, p. 179-192.
- COLAGRANDE, O. ; SILVA, A. 1981b. Considerazioni analitiche e tecnologiche sui diversi costituenti azotati dei vini spumanti. **Industrie Delle Bevande**, Pinerolo, v. 10, p. 349-363.
- COLAGRANDE, O. ; SILVA, A. ; CASOLI A. 1984. Acides aminés dans les vins mousseux. **Connaissance de la Vigne et du Vin**, Talence, v. 18, p. 27-48.
- DE ROOIJ, J. F. M. ; HAKKAART, M. J. J. Great Britain, Unilever PLC. 1985. **Yeast extract food flavour**. Int. Cl. ⁴ A23 1/28. 31 jan.; 3 sep. 1986.
- DOI, E. ; HAYASHI, R. ; HATA, T. 1967. Purification of yeast proteinases. Part II. Purification and some properties of yeast proteinase C. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, Tokio, v. 31, p. 160-169.
- DOULAH, M. S. 1977. Mechanism of disintegration of biological cells in ultrasonic cavitation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 19, p. 649-660.
- DREYER, T. ; BIEDERMANN, K. ; OTTESEN, M. 1983. Yeast proteinase in beer. **Carlsberg Research Communications**, Copenhagen, v. 48, p. 249-253.
- ESCHENBRUCH, R. ; BONISH, P. ; FISHER, B. M. 1978. The production of H₂S by pure culture wine yeasts. **Vitis**, Siebeldingen Uber Landau, v. 17, p. 67-74.
- FARFÁN, J. A. 1990. **Química de proteínas aplicada à ciência e tecnologia de alimentos**. Campinas, Editora da Unicamp. 134p.
- FENTON, D. M. 1982. Solvent treatment for b-D-galactosidase release from yeast cells. **Enzyme Microbiology Technology**, Surrey, v. 4, p. 229-232.
- FERRARI, G. ; MEUNIER, J. M. ; FEUILLAT, M. 1987. Dosage des acides gras totaux du vin et des levures de vinification. **Sciences des Aliments**, Paris, v. 7, p. 61-76.
- FERRARI, G. ; FEUILLAT, M. 1988. L'élevage sur lie des vins blancs de Bourgogne. I. Etude des composés azotés, des acides gras et analyse sensorielle des vins. **Vitis**, Siebeldingen Uber Landau, v. 27, p. 183-197.

- FEUILLAT, M. France, Université de Dijon. 1986. **Autolysats de levures à usage oenologique et leur procédé de fabrication.** Int. Cl. ⁴ C12N 1/06, 24 nov.; 27 mai 1988.
- FEUILLAT, M. ; CHARPENTIER, C. ; PICCA, G. ; BERNARD, P. 1988. Production de colloïdes par les levures dans les vins mousseux élaborés selon la méthode champenoise. **Revue Française des Oenologues**, Paris, Cahiers Scientifiques, n. 111, p. 36-45.
- FEUILLAT, M. ; CHARPENTIER, C. 1982. Autolysis of yeast in champagne. **American Journal of Enology and Viticulture**, Reedley, v. 33, p. 6-13.
- FREY, J. ; RÖHM K. H. 1979. The glucose-induced inactivation of aminopeptidase I in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 100, p. 261-264.
- FUMI, M. D. ; TRIOLI, G. ; SILVA, A. ; FAORO, F. 1987. Autolisi di *Saccharomyces cerevisiae* in vini spumantizzati in bottiglia: uno studio biochimico ultrastrutturale. **Industrie delle Bevande**, Pinerolo, Ottobre, p. 340-344.
- GRZYWNOWICZ, G. ; LOBARZEWSKI, J. ; WAWRZKIEWICS, K. ; WOLSKI, T. 1989. Comparative characterization of proteolytic enzymes from *Trichophyton gallinae* and *Trichophyton verrucosum*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxfordshire, v. 27, p. 319-328.
- HANSEN, R. J. ; SWITZER, R. L. ; HINZE, H. ; HOLZER, H. 1977. Effects of glucose and nitrogen source on the levels of proteinases, peptidases, and proteinase inhibitors in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 496, p. 103-114.
- HAYASHI, R. 1976. Carboxypeptidase Y. **Methods in Enzymology**, New York, v. 45B, p. 568-587.
- HOLZER, H. 1976. Catabolite inactivation in yeast. **TIBS**, Cambridge, August, p. 178-181.
- HOUGH, J. S. ; MADDIX, I. S. 1970. Yeast autolysis. **Process Biochemistry**, London, v. 5 p. 50-52.
- HUNTER, J. B. ; ASENJO, J. A. 1987. Kinetics of enzymatic lysis and disruption of yeast cells. II. A simple model of lysis kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 30, p. 481-490.

- HUNTER, J. B. ; ASENJO, J. A. 1988. A structured mechanistic model of the kinetics of enzymatic lysis and disruption of yeast cells. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 31, p. 929-943.
- JONES, E. W. 1991. Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods in Enzymology**, New York, v. 194, p. 428-453.
- KELLY-TREADWELL P. H. 1988. Protease activity in yeast: its relationship to autolysis and champagne character. **The Australian Grapegrower and Winemaker**, Adelaide, April, p. 58-66.
- KITAMURA, K. 1982. Re-examination of Zymolyase purification. **Agricultural Biological Chemistry Journal**, Tokio, v. 46, p. 963-969.
- KOLLAR, R. ; STURDIK, E. ; FARKAS, V. 1991. Induction and acceleration of yeast lysis by addition of fresh yeast autolysate. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 13, p. 543-546.
- LENNEY, J. F. ; DALBEC, J. M. 1967. Purification and properties of two proteinases from *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 120, p. 42-48.
- LENNEY, J. F. ; MATILE, P. ; WIEMKEN, A. ; SCHELLENBERG, M. ; MEYER J. 1974. Activities and cellular localization of yeast proteases and their inhibitors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 60, p. 1378-1383.
- LEROY, M. J. ; CHARPENTIER, M. ; DUTEURTRE, B. ; FEUILLAT, M. ; CHARPENTIER, C. 1990. Yeast autolysis during champagne aging. **American Journal of Enology and Viticulture**, Reedley, v. 41, p. 21-28.
- LLAUBÈRES, R. M. ; DUBOURDIEU, D. ; VILLETAZ, J. 1987. Exocellular polysaccharides from *Saccharomyces* in wine. **Journal of Science and Food Agriculture**, London, v. 41, p. 227-286.
- LUBBERS, S. ; VOILLEY, A. ; CHARPENTIER, C. ; FEUILLAT, M. 1993. Mise en évidence d'interactions entre les macromolécules et les arômes du vin. **Revue Française des OEnologues**, Paris, v. 144, p.12-18.

- LURTON, L. 1989. Étude de la protéolyse des levures de vinification lors de l'élevage d'un vin sur ses lies. **Revue Française des OEnologues**, Paris, n. 113, p. 35-41.
- LURTON, L. ; SEGAIN, J. P. ; FEUILLAT, M. 1989. Étude de la protéolyse au cours de l'autolyse de levures en milieu acide. **Sciences des Aliments**, Paris, v. 9, p.111-124.
- MARGUERI, G. ; VERSINI, G. ; DALLA SERRA, A. ; GIANOTTI, L. ; PELLEGRINI, R. ; MATTAREI, C. 1984. L'autolisi del lievito in enologia. **Vignevini**, Bologna, v. 9, p. 25-28.
- MARKUS, R. 1968. *Elementos de estatística aplicada*. Porto Alegre. UFRGS, Faculdade de Agronomia. **Centro Acadêmico Leopoldo Cortês**. 303 p.
- MATERN, H. ; BETZ, H. ; HOLZER, H. 1974. Compartmentation of inhibitors of proteinases A and B and carboxypeptidase Y in yeast. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 60, p. 1051-1057.
- MODRA, E. J. ; WILLIAMS, P. J. 1988. Are proteases active in wines and juices? **The Australian Grapegrower and Winemaker**, Adelaide, april , p. 42-46.
- MOLNÁR, I. ; OURA, E. ; SUOMALAINEN, H. 1980a. Determination of the autolysis of champagne yeast by using ¹⁴C labelled yeasts. **Acta Alimentaria**, Budapest, v. 9, p. 305-312.
- MOLNÁR, I. ; OURA, E. ; SUOMALAINEN, H. 1980b. Changes in the activities of certain enzymes of champagne yeast during storage of sparkling wine. **Acta Alimentaria**, Budapest, v. 9, p. 313-324.
- MOLNÁR, I. ; OURA, E. ; SUOMALAINEN, H. 1981. Study of volatile substances produced during autolysis of Champagne yeasts. **Acta Alimentaria**, Budapest, v. 10, p. 27-36.
- MORA, S. J. ; ESCHENBRUCH, R. ; KNOWLES, S. J. ; SPEDDING, D. J. 1986. The formation of dimethyl sulphide during fermentation using a wine yeast. **Food Microbiology**, London, v. 3, p. 27-32.
- NAGODAWITHANA, T. 1992. Yeast derived flavors and flavor enhancers and their probable mode of action. **Food Technology**, Chicago, v. 46, p. 140-144.

- NAVARRE, C. 1988. **L'Oenologie**. Paris, Technique et Documentation (Lavoisier). 302 p.
- NEEFF, J. ; HÄGELE, E. ; NAUHAUS, J. ; HEER, U. ; MECKE D. 1987. Evidence for catabolite degradation in the glucose-dependent inactivation of yeast cytoplasmic malate dehydrogenase. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 87, p. 489-495.
- NEKLYUDOV, A. D. ; FEDOROVA, N. V. ; ILYUKHINA, V. P. ; LISITSA, E. P. 1993. Enzyme profile of autolyzing yeasts of the genus *Saccharomyces*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 29, p. 547-554. ←
- NEKLYUDOV, A. D. ; FEDOROVA, N. V. ; ILYUKHINA, V. P. ; KUPOV, Kh. A. ; KRAVCHENKO, V. L. 1994. Effect of aminoacids and polypeptides on the process of autolysis of biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 30, p. 104-107. ←
- PELCZAR, M. ; REID, R. ; CHAN, E. C. S. 1980. **Microbiologia**. São Paulo. McGraw Hill do Brasil. 566 p.
- PERIN, J. ; LLORCA, S. 1974. Allure générale de l'évolution des matières azotées au cours de la vinification et de la champagnisation. **Le Vigneron Champenois**, Epernay, v. 7, p. 272-283.
- PITON, F. ; CHARPENTIER, M. ; TROTON, D. 1988. Cell wall and lipid changes in *Saccharomyces cerevisiae* during aging of champagne wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, Reedley, v. 39, p. 221-226.
- RIZZON, L. A. ; MIELE, A. ; ZANUZ, M. C. 1994. Composição química de alguns vinhos espumantes brasileiros. **Boletim SBCTA**, v. 28(1), p. 25-32. ←
- RYAN, E. M. ; WARD, O. P. 1985. Study of the effect of b-1,3-glucanase from *Basidiomycete* QM 806 on yeast extract production. **Biotechnology letters**, Kew, v. 07, p. 409-412.
- SAHEKI, T. ; MATSUDA, Y. ; HOLZER, H. 1974. Purification and characterization of macromolecular inhibitors of proteinase A from yeast. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 47, p. 325-332.
- SAHEKI, T. ; HOLZER, H. 1975. Proteolytic activities in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 384, p. 203-214.

- SATO, M. ; MORIMOTO, H. ; OOHASHI T. 1987. Increase of intracellular proteinase activities in extinct cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, Tokio, v. 51, n. 9, p. 2609-2610.
- SCOPES, R. K. 1994. **Protein purification. Principles and practice**. 3. ed. New York, Springer-Verlag, 380p.
- SCOTT, J. H. ; SCHEKMAN, R. 1980. Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 142, p. 414-423.
- SILVA, A. ; FUMI, M. D. ; MONTESISSA, G. ; COLOMBI, M. G. e COLAGRANDE, O. 1987. Incidence de la conservation en présence de levures sur la composition des vins mousseux. **Connaissance de la Vigne et du Vin**, Talence, v. 21, p. 141-162.
- SLAUGHTER, J. C. ; NOMURA, T. 1992a. Activity of the vacuolar proteases of yeast and the significance of the cytosolic protease inhibitors during the post-fermentation decline fase. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 98, p. 335-338.
- SLAUGHTER, J. C. ; NOMURA, T. 1992b. Autocalytic degradation of proteins in extracts of a brewing strain of *Saccharomyces cerevisiae*. The role of endoproteinases and exopeptidases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Reedley, v. 37, p. 638-642.
- SUAREZ, M. A. ; POLO, M. C. ; LLAGUNO, C. 1979. Etude de la composition de vins mousseux pendant la prise de mousse au cours du vieillissement en bouteilles. **Connaissance de la Vigne e du Vin**, Talence, v. 13, p. 199-211.
- SUGIMOTO, H. 1974. Synergistic effect of ethanol and sodium chloride on autolysis of baker's yeast for preparing food-grade yeast extracts. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 39, p. 939-942.
- SUGIMOTO, H. ; TAKEUCHI, H. ; YOKOTSUKA, T. Japan, Ajinomoto Company. 1972. **Process for autolysis of yeast**. Int. Cl.² A23L 1/28. 17 oct. ; 3 oct. 1973.
- SUZZI, G. 1990. La capacità autolitica come carattere di selezione in *Saccharomyces cerevisiae*. **Industrie delle Bevande**, Pinerolo v. 19, p. 318-319,321.

- TANEKAWA, T. ; TAKASHIMA, H. ; TOMOYOSHI, H. Japan, Ajinomoto Company. 1980. **Production of yeast extract containing flavoring**. Int. Cl.³ A23L 1/28; 5 jan. ; 2 jan. 1980.
- TAKEO, K. ; YAMAMURA, M. ; KAMIHARA, T. 1989. Ultrastructural alterations in *Saccharomyces cerevisiae* cells in association with elevated temperature-induced autolysis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 61, p. 297-300.
- TUSSEAU, D. ; VAN LAER, S. 1993. Étude des macromolécules des vins de champagne. **Sciences des Aliments**, Paris, v. 13, p. 463-482.
- USSEGLIO - TOMASSET, L. 1976. Les colloïdes glucidiques solubles des mouts e des vins. **Connaissance de la Vigne et du Vin**, Talence, v. 10, p. 193 - 226.
- USSEGLIO-TOMASSET, L. ; BOSIA, P. D. ; DI STEFANO, R. ; CASTINO, M. 1983. Oggettiva influenza del contatto con i lieviti sulle caratteristiche degli spumanti preparati con il metodo classico. **Vini d'Italia**, Roma, v. 25 , p. 3-9.
- VAN GAVER, D. ; HUYGHEBAERT, A. 1989. Extraction of oligopeptides and proteins from bakers yeast cells by airdrying autolysis. **Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology**, Bruxelles, v. 44, p. 83-87.
- VOSTI, D. C. ; JOSLYN, M. A. 1954. Autolysis of baker's yeast. **Applied Microbiology**, Washington, v. 2, p. 70-8.
- YAMAMURA, M. ; TAKEO, K. ; KAMIHARA, T. 1991. *Saccharomyces* yeast cells grown at elevated temperatures are suscetible to autolysis. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, Tokio, v. 55, p. 2861-2864.
- WHITAKER, J. R. 1972. **Principles of enzymology for the food sciences**. New York. Marcel Dekker, Inc. 636 p. (Food Sciences).
- ZAMBONELLI, C. ; GRAZIA, L. ; GIUDICI, P. ; TINI, V. 1991. Autolysogeny and high isobutyl alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Microbiology**, Heidelberg, v. 23, p. 281-283.

8. APÊNDICES

APÊNDICE 1

QUADRO 1. Eficiência dos métodos de ruptura permeabilização do envelope celular de *S. cerevisiae* representada pela liberação de proteases no sobrenadante após um pré-tratamento das células à - 5°C/24h em tampão fosfato de pH 7,0. Resultados em U/mg células secas.

Pérolas de vidro:	Sonicador:	Moinho coloidal:
0,474	0,599	0,813
0,558	0,666	0,744
0,487	0,658	1,168
m = 0,506 (b)	m = 0,641 (a,b)	m = 0,908 (a)

QUADRO 2. Análise estatística dos resultados dos ensaios, determinando a eficiência dos métodos de ruptura e permeabilização do envelope celular de *S. cerevisiae* representada pela liberação de proteases no sobrenadante após um pré-tratamento das células à - 5°C/24h em tampão fosfato de pH 7,0.

Causas da variação:	Graus de liberdade:	Soma dos quadrados(SQ)	Quadrado médio(QM):	Teste F:
Tratamentos:	2	0,251	0,125	7,0*
Erro experimental:	6	0,110	0,018	

* A diferença entre as médias dos tratamentos é significativa ($P < 0,05$).
O coeficiente de variação do experimento é de 19,6%.

QUADRO 3. Eficiência dos métodos de ruptura e permeabilização do envelope celular de *S. cerevisiae* representada pela liberação de proteases no sobrenadante após um pré-tratamento das células à 30°C/24h em tampão fosfato de pH 7,0. Resultados em U/mg de células secas.

Etanol/120 min:	Moinho coloidal:	Pérolas de vidro:	Sonicador:
0,408	0,796	0,920	0,974
0,454	0,767	0,886	0,928
0,437	0,905	0,853	0,907
m = 0,433 (d)	m = 0,823 (b,c)	m = 0,886 (a,b)	m = 0,936 (a)

QUADRO 4. Análise estatística dos resultados dos ensaios, determinando a eficiência dos métodos de ruptura e permeabilização do envelope celular de *S. cerevisiae* representada pela liberação de proteases no sobrenadante após um pré-tratamento das células à 30°C/24h em tampão fosfato de pH 7,0.

Causas da variação:	Graus de liberdade:	Soma dos quadrados(SQ):	Quadrado médio(QM):	Teste F:
Tratamentos:	3	0,472	0,157	73,9*
Erro experimental:	8	0,017	0,002	

* A diferença entre as médias dos tratamentos é altamente significativa (P<0,01). O coeficiente de variação do experimento é de 6%.

QUADRO 5. Influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10% vol) de pH 3,0 na inibição das proteases de células de *S. cerevisiae*. O extrato celular foi obtido em tampão hidroalcoólico de pH 3,0. Resultados em U/mg de células secas.

20°C	30°C	40°C	54°C
0,248	0,165	0,174	0,210
0,256	0,195	0,174	0,210
0,259	0,180	0,221	0,199
m = 0,254 (a)	m = 0,180 (c)	m = 0,190 (c)	m = 0,206 (b,c)

QUADRO 6. Análise estatística dos resultados determinando a influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10% vol) de pH 3,0 na inibição das proteases de células de *S. cerevisiae*. O extrato celular foi obtido em tampão hidroalcoólico de pH 3,0.

Causas da variação:	Graus de liberdade:	Soma dos quadrados(SQ):	Quadrado médio(QM):	Teste F:
Tratamentos:	3	0,010	0,0033	26,4*
Erro experimental:	8	0,001	0,0001	

* A diferença entre as médias dos tratamentos é muito significativa ($P < 0,01$).
O coeficiente de variação do experimento é de 5,4%.

QUADRO 7. Influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10% vol) de pH 3,0 na inibição das proteases de células de *S. cerevisiae*. O extrato celular foi obtido em tampão fosfato de pH 7,0. Resultados em U/mg de células secas.

20°C	30°C	40°C	54°C
0,419	0,163	0,215	0,232
0,292	0,204	0,187	0,163
0,353	0,135	0,157	0,124
m = 0,355 (a)	m = 0,167 (b)	m = 0,186 (b)	m = 0,173 (b)

QUADRO 8. Análise estatística dos resultados, determinando a influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10% vol) de pH 3,0 na inibição das proteases de células de *S. cerevisiae*. O extrato celular foi obtido em tampão fosfato de pH 7,0.

Causas da variação:	Graus de liberdade:	Soma dos quadrados(SQ):	Quadrado médio(QM):	Teste F:
Tratamentos:	3	0,072	0,0240	10,1*
Erro experimental:	8	0,019	0,0024	

A diferença entre as médias dos tratamentos é muito significativa ($P < 0,01$).

O coeficiente de variação do experimento é de 22%.

QUADRO 9. Influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10% vol) de pH 3,0 na liberação de compostos nitrogenados intracelulares de baixo peso molecular de células de *S. cerevisiae*. Resultados da proteína solúvel em µg/mg de células secas.

20°C:	30°C	40°C	54°C
13,3	163,2	193,9	144,7
12,0	154,4	188,9	174,4
12,4	158,3	177,8	195,7
12,3	129,9	179,7	146,1
12,5	146,4	176,5	160,6
12,6	140,1	189,3	168,2
m = 12,5 (c)	m = 148,7 (b)	m = 184,3 (a)	m = 165,0 (a,b)

QUADRO 10. Análise estatística dos resultados, determinando a influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10% vol) de pH 3,0 na liberação de compostos nitrogenados intracelulares de baixo peso molecular de células de *S. cerevisiae*.

Causas da variação:	Graus de liberdade:	Soma dos quadrados(SQ)	Quadrado médio(QM):	Teste F:
Tratamentos:	3	109834	36611,3	255,9*
Erro experimental:	20	2861	143,05	

*A diferença entre as médias dos tratamentos é muito significativa ($P < 0,01$). O coeficiente de variação do experimento é de 9,4%.

QUADRO 11. Influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10% vol) de pH 3,0 na hidrólise de compostos nitrogenados intracelulares de células de *S. cerevisiae*. O extrato foi obtido em tampão hidroalcoólico de pH 3,0. Os resultados da proteína solúvel são expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de células secas.

20°C	30°C	40°C	54°C
15,4	22,2	19,3	13,6
18,0	19,4	19,2	13,3
21,5	19,2	16,2	14,5
m = 18,3 (a)	m = 20,3 (a)	m = 18,2 (a)	m = 13,8 (b)

QUADRO 12. Análise estatística dos resultados, determinando a influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10% vol) de pH 3,0 na hidrólise de compostos nitrogenados intracelulares de células de *S. cerevisiae*. O extrato foi obtido em tampão hidroalcoólico de pH 3,0.

Causas da variação:	Graus de liberdade:	Soma dos quadrados(SQ):	Quadrado médio(QM):	Teste F:
Tratamentos:	3	67,3	22,4	5,8*
Erro experimental:	8	31,3	3,9	

* A diferença entre as médias é significativa ($P < 0,05$).
O coeficiente de variação do experimento é de 11,2%.

QUADRO 13. Influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10% vol) de pH 3,0 na hidrólise de compostos nitrogenados intracelulares de células de *S. cerevisiae*. O extrato foi obtido em tampão fosfato de pH 7,0. Os resultados da proteína solúvel são expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de células secas.

20°C	30°C	40°C	54°C
53,3	28,8	29,1	14,7
63,4	37,3	34,1	17,6
65,5	29,2	30,0	18,2
m = 60,7 (a)	m = 31,8 (b)	m = 31,1 (b)	m = 16,8 (c)

QUADRO 14. Análise estatística dos resultados, determinando a influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10% vol) de pH 3,0 na hidrólise de compostos nitrogenados intracelulares de células de *S. cerevisiae*. O extrato foi obtido em tampão fosfato de pH 7,0.

Causas da variação:	Graus de liberdade:	Soma dos quadrados(SQ):	Quadrado médio(QM):	Teste F:
Tratamentos:	3	3054,4	1018,1	53,6*
Erro experimental:	8	152,3	19	

* A diferença entre as médias dos tratamentos é muito significativa ($P < 0,01$). O coeficiente de variação do experimento é de 12,4%.

QUADRO 15. Evolução da atividade proteásica intracelular em função do tempo (meses) de maturação das células de *S. cerevisiae* no "vinho espumante". Resultados expressos em U/mg de células secas.

0	1	2	3
0,639	0,150	0,056	0,147
0,464	0,279	0,096	0,124
0,507	0,072	0,077	0,089
m = 0,537 (a)	m = 0,167 (b)	m = 0,076 (b)	0,120 (b)

QUADRO 16. Análise estatística dos resultados, determinando a evolução da atividade proteásica intracelular em função do tempo (meses) de maturação das células de *S. cerevisiae* no "vinho espumante".

Causas da variação:	Graus de liberdade:	Soma dos quadrados(SQ):	Quadrado médio(QM):	Teste F:
Tratamentos:	3	0,401	0,13370	31,5*
Erro experimental:	8	0,034	0,00425	

* A diferença entre as médias dos tratamentos é muito significativa ($P < 0,01$).
O coeficiente de variação do experimento é de 29,0 %.

QUADRO 17. Evolução da concentração de compostos nitrogenados de baixo peso molecular no "vinho espumante" em função do tempo (meses) de maturação das células de *S. cerevisiae*. Os resultados da proteína solúvel são expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de células secas.

0	1	2	3
238,8	297,6	371,6	350,7
222,0	302,4	368,1	329,4
230,4	295,2	363,5	319,3
m = 230,4 (d)	m = 298,4 (c)	m = 367,7 (a)	333,1 (b)

QUADRO 18. Análise estatística dos resultados, determinando a evolução da concentração de compostos nitrogenados de baixo peso molecular no "vinho espumante" em função do tempo (meses) de maturação das células de *S. cerevisiae*.

Causas da variação:	Graus de liberdade:	Soma dos quadrados(SQ)	Quadrado médio(QM):	Teste F:
Tratamentos:	3	52963	17654,3	197,8*
Erro experimental:	8	714	89,25	

* A diferença entre as médias dos tratamentos é muito significativa ($P < 0,01$).
O coeficiente de variação do experimento é de 3,1 %.

QUADRO 19. Evolução da concentração de compostos nitrogenados intracelulares de baixo peso molecular em função do tempo (meses) de maturação das células de *S. cerevisiae* no "vinho espumante". Os resultados da proteína solúvel são expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de células secas.

0	1	2	3
30,8	32,9	67,5	44,6
31,4	34,0	54,5	41,3
29,9	44,0	57,5	43,6
m = 30,7 (c)	m = 37,0 (c)	m = 59,8 (a)	43,2 (b,c)

QUADRO 20. Análise estatística dos resultados, determinando a evolução da concentração de compostos nitrogenados de baixo peso molecular em função do tempo (meses) de maturação das células de *S. cerevisiae* no "vinho espumante".

Causas da variação:	Graus de liberdade:	Soma dos quadrados(SQ):	Quadrado médio(QM):	Teste F:
Tratamentos:	3	1412	470,7	21,6*
Erro experimental:	8	174,3	21,8	

* A diferença entre as médias dos tratamentos é muito significativa ($P < 0,01$).
O coeficiente de variação do experimento é de 10,9 %.

QUADRO 21. Evolução da atividade proteásica no "vinho espumante" em função do tempo (meses) de maturação e dos tratamentos. Resultados expressos em U/mg de células secas.

Tratamento:	0	1	2	3
T	0,620	0,772	0,951	1,860
T	0,882	0,785	1,282	2,439
T	0,648	1,323	1,254	2,398
médias	0,717	0,96	1,162	2,232
E20	0,551	1,061	1,240	3,032
E20	0,958	1,888	1,130	1,750
E20	0,427	0,648	0,841	1,846
médias	0,645	1,199	1,070	2,209
E40	0,620	1,433	0,827	1,695
E40	0,496	1,736	0,813	1,764
E40	0,606	0,868	0,703	1,006
médias	0,574	1,346	0,781	1,488

T: Testemunha.

E20: Adição de 5% em volume de um extrato de leveduras (0,025 g/ml) obtido com um pré-tratamento a 20°C/48h.

E40: Adição de 5% em volume de um extrato de leveduras (0,025 g/ml) obtido com um pré-tratamento a 40°C/48h.

QUADRO 22. Análise estatística dos resultados, demonstrando a evolução da atividade proteásica no "vinho espumante" em função do tempo (meses) de maturação e dos tratamentos.

a. No tempo 0

Causas da variação:	Graus de liberdade:	Soma dos quadrados(SQ):	Quadrado médio(QM):	Teste F:
Tratamentos:	2	0,0306	0,0153	0,45*
Erro	6	0,205	0,0342	
experimental:				

* A diferença entre as médias dos tratamentos não é significativa.
O coeficiente de variação do experimento é de 28,7 %.

b. No tempo 1

Causas da variação:	Graus de liberdade:	Soma dos quadrados(SQ):	Quadrado médio(QM):	Teste F:
Tratamentos:	2	0,227	0,114	0,5*
Erro	6	1,383	0,230	
experimental:				

* A diferença entre as médias dos tratamentos não é significativa.
O coeficiente de variação do experimento é de 41 %.

c. No tempo 2

Causas da variação:	Graus de liberdade:	Soma dos quadrados(SQ):	Quadrado médio(QM):	Teste F:
Tratamentos:	2	0,238	0,119	4,4*
Erro	6	0,162	0,027	
experimental:				

* A diferença entre as médias dos tratamentos não é significativa.
O coeficiente de variação do experimento é de 16 %.

d. No tempo 3

Causas da variação:	Graus de liberdade:	Soma dos quadrados(SQ):	Quadrado médio(QM):	Teste F:
Tratamentos:	2	1,074	0,537	2,04*
Erro experimental:	6	1,58	0,263	

* A diferença entre as médias dos tratamentos não é significativa.
O coeficiente de variação do experimento é de 26 %.

QUADRO 23. Evolução da concentração de compostos nitrogenados de baixo peso molecular no "vinho espumante" em função do tempo (meses) de maturação das células de *S. cerevisiae* e dos tratamentos. Os resultados da proteína solúvel são expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de células secas.

Tratamento:	0	1	2	3
T	182,6	334,2	364,0	350,2
T	189,5	330,7	328,4	369,8
T	197,5	325,0	323,8	376,6
média	189,9 (c)	330,0 (c)	338,7 (c)	365,6 (c)
E20	257,2	373,2	393,9	401,9
E20	254,9	368,6	421,4	416,8
E20	263,0	365,2	401,9	416,8
média	258,4 (b)	369,0 (b)	405,7 (b)	411,8 (b)
E40	579,9	620,1	600,6	654,5
E40	581,0	596,0	616,6	662,6
E40	594,8	617,8	624,7	647,7
médias	585,2 (a)	611,3 (a)	614,0 (a)	654,9 (a)

T: Testemunha.

E20: Adição de 5% em volume de um extrato de leveduras (0,025 g/ml) obtido com um pré-tratamento a 20°C/48h.

E40: Adição de 5% em volume de um extrato de leveduras (0,025 g/ml) obtido com um pré-tratamento a 40°C/48h.

QUADRO 24. Análise estatística dos resultados, demonstrando a evolução da concentração de compostos nitrogenados de baixo peso molecular no "vinho espumante" em função do tempo (meses) de maturação das células de *S. cerevisiae* e dos tratamentos.

a. No tempo 0

Causas da variação:	Graus de liberdade:	Soma dos quadrados(SQ)	Quadrado médio(QM):	Teste F:
Tratamentos:	2	267848,8	1339224,4	2831*
Erro experimental:	6	284	47,3	

* A diferença entre as médias dos tratamentos é muito significativa ($P < 0,01$). O coeficiente de variação do experimento é de 2 %.

b. No tempo 1

Causas da variação:	Graus de liberdade:	Soma dos quadrados(SQ):	Quadrado médio(QM):	Teste F:
Tratamentos:	2	139451,2	69725,6	968*
Erro experimental:	6	431,7	42	

* A diferença entre as médias dos tratamentos é muito significativa ($P < 0,01$). O coeficiente de variação do experimento é de 1,9 %.

c. No tempo 2

Causas da variação:	Graus de liberdade:	Soma dos quadrados(SQ)	Quadrado médio(QM):	Teste F:
Tratamentos:	2	12363,5	61801,7	222,1*
Erro experimental:	6	1669,3	278,2	

* A diferença entre as médias dos tratamentos é muito significativa ($P < 0,01$). O coeficiente de variação do experimento é de 3,7 %.

d. No tempo 3

Causas da variação:	Graus de liberdade:	Soma dos quadrados(SQ):	Quadrado médio(QM):	Teste F:
Tratamentos:	2	144993,7	72496,9	685*
Erro experimental:	6	635	105,8	

* A diferença entre as médias dos tratamentos é muito significativa ($P < 0,01$).
O coeficiente de variação do experimento é de 2,2 %.

QUADRO 25. Evolução da concentração de compostos nitrogenados intracelulares de baixo peso molecular em função do tempo (meses) de maturação das células de *S. cerevisiae* no "vinho espumante" e dos tratamentos. Os resultados da proteína solúvel são expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de células secas.

Tratamento:	0	1	2	3
T	46,5	27,5	32,4	58,8
T	49,4	24,0	25,8	41,4
T	41,2	26,8	27,9	40,0
média	45,7	26,1 (a,b)	28,7	46,7
E20	50,2	19,9	35,0	41,2
E20	40,2	21,7	31,4	46,9
E20	40,1	22,3	32,2	43,4
média	43,5	21,3 (c)	32,9	43,8
E40	39,9	25,7	26,9	32,0
E40	40,7	25,3	28,0	44,3
E40	38,3	30,8	29,9	39,0
média	39,6	27,3 (a)	28,3	38,4

T: Testemunha.

E20: Adição de 5% em volume de um extrato de leveduras (0,025 g/ml) obtido com um pré-tratamento a 20°C/48h.

E40: Adição de 5% em volume de um extrato de leveduras (0,025 g/ml) obtido com um pré-tratamento a 40°C/48h.

QUADRO 26. Análise estatística dos resultados, demonstrando a evolução da concentração de compostos nitrogenados intracelulares de baixo peso molecular em função do tempo (meses) de maturação das células de *S. cerevisiae* no "vinho espumante" e dos tratamentos.

a. No tempo 0

Causas da variação:	Graus de liberdade:	Soma dos quadrados(SQ):	Quadrado médio(QM):	Teste F:
Tratamentos:	2	56,6	28,3	1,6*
Erro experimental:	6	104,9	17,5	

* A diferença entre as médias dos tratamentos não é significativa.
O coeficiente de variação do experimento é de 9,8 %.

b. No tempo 1

Causas da variação:	Graus de liberdade:	Soma dos quadrados(SQ):	Quadrado médio(QM):	Teste F:
Tratamentos:	2	60,7	30,4	6,3*
Erro experimental:	6	28,8	4,8	

* A diferença entre as médias dos tratamentos é significativa ($P < 0,05$).
O coeficiente de variação do experimento é de 8,8 %.

c. No tempo 2

Causas da variação:	Graus de liberdade:	Soma dos quadrados(SQ):	Quadrado médio(QM):	Teste F:
Tratamentos:	2	38,2	19,1	3,3*
Erro experimental:	6	34,6	5,8	

* A diferença entre as médias dos tratamentos não é significativa.
O coeficiente de variação do experimento é de 8,0 %.

d. No tempo 3

Causas da variação:	Graus de liberdade:	Soma dos quadrados(SQ):	Quadrado médio(QM):	Teste F:
Tratamentos:	2	108,8	54,4	1,1*
Erro experimental:	6	308	51,3	

* A diferença entre as médias dos tratamentos não é significativa.
O coeficiente de variação do experimento é de 16,7 %.

VITA

Jean Philippe Palma Révillion, filho de Pierre Leonard Révillion e Deny Palma Révillion nasceu em 27 de outubro de 1964, em Porto Alegre, no Rio Grande do Sul.

Estudou no Colégio Farroupilha, onde completou seus estudos de primeiro e segundo graus. Em 1983 ingressou na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, graduando-se como Engenheiro-Agrônomo em 1988. Em agosto de 1989 iniciou seus estudos de Especialização em Viticultura e Enologia da Faculdade de Agronomia de Montpellier, concluindo-os em 1990. De janeiro de 1991 a janeiro de 1994 trabalhou como assistente de produção na empresa Provifin Ltda., elaboradora dos vinhos "Chandon". Em março de 1994 iniciou seus estudos de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente no Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Casou-se com Anya Sartori Piatnicki em 1994.

É membro da Sociedade de Engenheiro-Agrônomos do Rio Grande do Sul.