MD 1620 G2

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1620 (13) G2
(51) Int. Cl.[7]: C 12 H 1/14, 1/00;
C 12 P 21/00

(12) BREVET DE INVENȚIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. depozit: 97-0226
(22) Data depozit: 1995.10.27

(31) Nr.: 94/13261
(32) Data: 1994.10.31
(33) Țara: FR

(41) Data publicării cererii:
1999.05.31, BOPI nr. 5/1999

(43) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului pe răspunderea solicitantului:
2001.02.28, BOPI nr. 2/2001

(86) PCT/FR95/01426, 1995.10.27

(87) WO 96/13571; 1996.05.09

(71) Solicitant: FACULTE D'OENOLOGIE, FR

(72) Inventatori: MOINE Virginie, FR; DUBOURDIEU Denis, FR

(73) Titular: FACULTE D'OENOLOGIE, FR

(74) Mandatar: Glazunov Nicolai, MD

(54) Manoproteine, procedeu de extracție a acestora şi procedeu de tratare a vinului pentru stabilizarea lui față de sărurile tartrice şi proteine

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la substanțe biologice şi procedee de tratare a vinurilor, in particular pentru îmbunătățirea stabilității proteice a vinurilor albe şi roz, precum şi pentru prevenirea depunerii tartrului în vinurile albe, roz şi roşii.

Tratarea vinului pentru stabilizarea lui față de tartrați şi proteine constă în aceea că în vin se adaugă manoproteine extrase din pereții celulari ai

2

drojdiilor prin tratarea enzimatică cu ajutorul unui amestec de gluconaze β-1-3 şi β-1-6.

Rezultatul invenției constă în sporirea efectului inhibitor asupra formării sărurilor tartrice şi proteinelor.

Revendicări: 6
Figuri: 9

MD 1620 G2

Descriere:

Invenţia se referă la substanţe biologice şi procedee de tratare a vinurilor, în special pentru îmbunătăţirea stabilităţii proteice a vinurilor albe şi roze, precum şi pentru prevenirea depunerii tartrului in vinurile albe, roze şi roşii.

Se cunoaşte că în comercializarea vinurilor îmbuteliate se cere nu numai ca acestea să fie limpezi în momentul îmbutelierii, dar şi ca ele să rămână astfel un anumit timp, în special in cazul vinurilor care sunt depozitate o perioadă relativ lungă.

În prezent este cunoscut că tratamentele de stabilizare a vinurilor nu sunt satisfăcătoare, dacă este vorba despre precipitatele de săruri tartrice sau proteice, denumite în oenologie "depreciere tartrică şi proteică".

De fapt în timpul depozitării vinurilor albe deprecierea proteică se manifestă prin turbiditate sau depozite specifice care apar în sticlă, atunci când temperatura de depozitare a vinului este ridicată şi/sau ca rezultat al îmbogăţirii cu tanin din dop.

O soluţie cunoscută [1] implică tratarea musturilor şi vinurilor cu bentonit, dar dozajele necesare în ce priveşte cerinţele existente pot fi suficient de mari pentru a produce devieri de la caracteristicile organoleptice ale vinurilor astfel tratate.

S-au făcut şi alte încercări de-a lungul liniilor enzimatice folosind proteaze exogene sau pe bază de drojdii de bere pentru a elimina proteinele responsabile de depreciere proteică, însă rezultatele nu au fost satisfăcătoare.

S-a arătat recent de către autorii invenţiei că în cursul depozitării vinurilor albe în adăposturi, îmbunătăţirile observate în stabilitatea proteică a acestora s-au datorat prezenţei manoproteinelor eliberate de drojdiile de bere.

În ce priveşte precipitarea sărurilor tartrice, prezente îndeosebi sub forma tartratului acid potasic, ele sunt prezentate sub formă suprasaturată în vinuri. În plus, în timpul stocării vinurilor pe timp de iarnă, frigul provoacă precipitări cristaline, dar în orice caz această precipitare se produce de asemenea în timp şi devine vizibilă în sticle.

S-au găsit metode de stabilizare a acestor săruri tartrice, iar în prezent sunt cunoscute trei astfel de metode [2, 3, 4].

Prima soluţie implică accelerarea precipitării prin menţinerea vinului un număr de săptămâni la temperaturi negative urmată de filtrarea lui pentru retragerea cristalelor.

A doua soluţie cuprinde o îmbunătăţire a celei anterioare prin adăugarea unor doze mari de cristale în vin astfel, incat tratamentul la temperatura scăzută devine mai eficient, iar durata lui este mai scurtă; filtrarea rămâne însă obligatorie pentru a scoate cristalele suplimentare şi cele care s-au dezvoltat.

A treia soluţie implică adăugarea de acid metatartric la vin, acest acid contracarând cristalizarea acizilor tartrici sub influenţa temperaturii joase. Efectul protector dispare imediat ce acidul metatartric se hidrolizează, fenomen care are loc cu atât mai rapid cu cât temperatura de depozitare a vinului este mai înaltă.

Soluţiile menţionate mai sus nu sunt satisfăcătoare întrucât primele două sunt îndelungate şi costisitoare, alterand in plus caracteristicile organoleptice ale vinurilor tratate.

În ce priveşte a treia soluţie, eficienţa ei este de scurtă durată, fiind de aceea limitată la vinurile destinate consumului timpuriu, în plus faţă de faptul că este necesară introducerea în vin a unui compus străin neconţinut iniţial în el.

Cea mai apropiată soluţie de esenţa prezentei invenţii se examinează manoproteinele extrase la cald din pereţii celulari ai drojdiei de bere aparţinând speciei *Saccharomyces cerevisiae* care au un efect inhibitor asupra cristalizării sărurilor tartrice [4].

Procedeul obţinerii acestor manoproteine implică solubilizarea acestora la căldură de 100°C într-un mediu apos şi colectarea lor fie directă, fie prin liofilizare sau precipitarea cu etanol cu uscarea precipitatului după centrifugare.

Eficacitatea preparatelor produse la testarea lor intr-un mediu model nu a fost încă verificată relativ la majoritatea vinurilor. In plus, prepararea manoproteinelor in modul descris mai sus nu aduce nici o contribuţie la îmbunătăţiri în ce priveşte instabilitatea vinurilor albe.

Obiectul invenţiei este de a asigura tratarea vinurilor albe, roşii sau roze pentru a le stabiliza în ce priveşte precipitatele tartrice şi proteice cu un efect pe termen suficient de lung, care să fie considerat permanent. În plus, tratamentul prevede adăugarea unei substanţe biologice, obţinute printr-un procedeu conform invenţiei, adică introducerea unei substanţe permise de legile de control al vinurilor, numită substanţă biologică, neavând miros şi fiind complet solubilă în vin.

Conform invenţiei, procedeul de tratare a vinului pentru stabilizarea lui faţă de sărurile tartrice şi proteice include adăugarea la vin a manoproteinelor extrase din pereţii celulari ai drojdiilor unde in calitate de manoproteine se utilizează manoproteinele obţinute conform procedeului de extragere a manoproteinelor propuse.

Tratamentul în mod mai specific implică adăugarea la vin a manoproteinelor extrase din peretele celular al drojdiei prin digestie enzimatică folosind gluconaze β-1-3 şi β-1-6.

Conform invenţiei, drojdiile folosite aparţin speciei *Saccharomyces cerevisiae,* iar cantitatea de manoproteine folosite în vin, este mai mică de 30 g/hl.

Invenţia se referă, de asemenea, la un procedeu de extragere a manoproteinelor care include incubarea pereţilor celulari ai drojdiilor într-un mediu apos şi colectarea manoproteinelor, unde incubarea se efectuează în prezenţa gluconazelor β-1-3 şi β-1-6, iar colectarea se efectuează prin separarea produselor solide şi concentrarea prin ultrafiltrare a fazei lichide. Acest procedeu include suplimentar uscarea produsului obţinut prin liofilizare sau atomizare, de exemplu pentru a asigura o manipulare confortabilă.

Procedeul conform invenţiei se caracterizează şi prin aceea că gluconaza β este de tipul β-1-3 şi β-1-6.

Invenţia mai prevede şi manoproteine obţinute prin procedeul de mai sus, care au un pic caracteristic obţinut la analiza prin cromatografie lichidă la presiune înaltă de separare moleculară, un pic caracteristic obţinut prin electroforeza capilară, care corespunde manoproteinei de 31800 Dalton, iar analiza prin electroforeză SDS PAGE arată prezenţa a două proteine de 41600 şi 31800 Dalton.

Se dau mai jos exemple de realizare a invenţiei în legătură şi cu figurile 1-9, care reprezintă:

- fig. 1, cromatograma înregistrată într-o operaţie de cromatografie, referitoare la separarea de manoproteine extrase prin digestie enzimatică;
- fig. 2, cromatograma manoproteinelor extrase la căldură;
- fig. 3, grafic obţinut prin electroforeză capilară a manoproteinelor extrase prin digestie enzimatică (MEE), comparat cu graficul manoproteinelor extrase prin digestie cu căldură (MEC);
- fig. 4, fracţii de proteine obţinute prin eluţie cu clorură de sodiu;
- fig. 5, indicele de turbiditate (NTU) pentru vinuri de referinţă şi pentru vinuri tratate cu diverse fracţii;
- fig. 6, fracţii de proteine obţinute prin eluţie cu α-D-manosidă;
- fig. 7, indicele de turbiditate (NTU) pentru vinuri de referinţă şi vinuri tratate cu diverse fracţii;
- fig. 8, comparaţie a concentraţiei de MP 32 în diverse fracţii;
- fig. 9, procentul de MP 32 în MEC şi MEE.

Procedeul conform invenţiei se realizează conform exemplului specific menţionat în cele ce urmează.

Se incubează la 40°C în apă pereţii celulari, in special de *Saccharomyces cerevisiae,* în prezenţa unui preparat de gluconază β, şi anume a celei comercializate de firma Novo cu marca Glucanex.

Acest preparat cuprinde activităţi de exo-β-(1-3)-gluconază, endo-β-(1-3)-gluconază şi exo-β-(1-6)-gluconază.

Ulterior se separă materialul solid.

Se concentrează faza lichidă, în special prin ultrafiltrare.

Masa uscată a produsului corespunde substanţial cu 50% din masa pereţilor celulari introduşi iniţial în preparat.

Produsul este cuprins din 88% polizaharide, 4% proteine şi 8% substanţe nedeterminate, fapt datorat indubitabil hidratării produsului.

Produsul este fără miros, solubil în apă şi vinuri şi nu blochează suprafeţele filtrante utilizate pentru filtrarea vinurilor.

Cu referire la fig. 1 şi 2 se poate sublinia că se observă o diferenţă considerabilă între graficele ilustrate în fiecare dintre aceste figuri prin detecţie la 225 nm pentru proteine şi prin detecţie refractometrică pentru polizaharide.

Intr-adevăr, graficul din fig. 2 prezintă un prim pic (X), care corespunde volumului gol al coloanei, şi un al doilea pic (Z), ce corespunde volumului total al coloanei.

Se va nota că graficul din fig. 1 ilustrează un al doilea pic (Y) în imediată vecinătate a picului (X) al volumului gol al coloanei care este absent in graficul din fig. 2.

Procedeul conform invenţiei permite extracţia şi conservarea unei manoproteine specifice.

Pe de altă parte, fiind analizate prin electroforeza capilară în condiţii de linişte peste o coloană de silice topită, manoproteinele extrase prin digestie enzimatică prezintă un pic (W), care corespunde manoproteinei responsabile de termostabilizarea proteinelor din vinul alb. Acest pic este absent in timpul analizei manoproteinelor extrase la căldură, folosind tot procedura de electroforeză capilară.

Ulterior se efectuează teste pentru a verifica efectele manoproteinelor extrase prin metoda enzimatică bazată pe diverse genuri de drojdie, toate aparţinând speciilor *Saccharomyces cerevisiae,* denumite “MEE” pe de o parte asupra stabilizării tartrice şi asupra stabilizării proteice, pe de altă parte.

1. Stabilizarea tartrică.

Se cunosc două tipuri de teste:

1. Determinarea indicelui de stabilitate tartrică.

Se introduce bitartrat de potasiu în probele ce urmează a fi testate în cantităţi variabile, solubilizate prin încălzire la 30°C şi răcite ulterior la -4°C.

Cu cat este mai stabil mediul, cu atât este mai mare cantitatea de bitartrat de potasiu necesară pentru a produce cristalizarea.

Estimarea cristalizării se face vizual sau determinând, prin fotometrie cu flacără, diferenţa de concentraţie a potasiului în vinul filtrat înainte şi după trecerea la condiţii de frig.

Un vin este considerat stabil dacă adăugarea a 75 mg de bitartrat de potasiu la 100 ml de probe nu cauzează cristalizarea.

Testul in mediul model.

Rezultatele testului sunt date mai jos, bazandu-le pe 100 ml de mediu model hidroalcoolic, compus din:

- 1.1 g/L clorură de potasiu;
- 2.1 g/L acid tartric;
- 10.5% etanol.

Parametrul variabil este cantitatea de hidrogen tartrat de potasiu (HTP), adăugat în doze de 0,50, 75, 100 şi 125 mg.

Probele sunt testate comparativ cu adăugarea de acid metatartric, manoproteine extrase la căldură (MEC) şi 3 soiuri de manoproteine extrase prin digestie enzimatică (MEE).

Rezultatele din tabelul 1 ilustrează diferenţele de concentraţie (mg/L) ale probelor înainte şi după răcire.

Tabelul 1

HTP mg/100 ml	0	50	75	100	125
Proba de referinţă	0	0	40	100	180
Meta acid 5 g/hl	0	0	0	0	0
Meta acid 10 g/hl	0	0	0	0	0
Meta acid 25 g/hl	0	0	0	0	0
MEC 10 g/hl	0	0	30	100	180
MEC 25 g/hl	0	0	0	20	100
MEC 50 g/hl	0	0	0	0	40
MEE1 10 g/hl	0	0	0	60	120
MEE1 25 g/hl	0	0	0	60	100
MEE1 50 g/hl	0	0	0	40	100
MEE2 10 g/hl	0	0	60	80	120
MEE2 25 g/hl	0	0	0	0	60
MEE2 50 g/hl	0	0	0	0	0
MEE3 10 g/hl	0	0	80	120	180
MEE3 25 g/hl	0	0	0	60	180
MEE3 50 g/hl	0	0	0	0	180

Se poate vedea că precipitarea bitartratului de potasiu în mediul sintetic se inhibă complet de acidul metatartric dar şi de către manoproteinele extrase prin acţiune enzimatică, precum şi că eficienţa, la doze identice, este uşor mai scăzută.

Testul cu un vin alb.

Tabelul 2 ilustrează rezultatele obţinute cu acidul metatartric, manoproteinele extrase cu căldură şi manoproteinele extrase prin digestie enzimatică.

Tabelul 2

HTP mg/100 ml	0	50	75	100	125
Proba de referinţă	0	20	40	60	80
Meta acid 5 g/hl	0	0	0	20	20
Meta acid 10 g/hl	0	0	0	0	0
Meta acid 25 g/hl	0	0	0	0	0
MEC 10 g/hl	0	20	40	40	60
MEC 25 g/hl	0	20	20	20	60
MEC 50 g/hl	0	0	40	40	40
MEE1 10 g/hl	0	20	20	20	20
MEE1 25 g/hl	0	0	0	60	100
MEE1 50 g/hl	0	0	0	0	0
MEE2 10 g/hl	0	0	0	20	60

MEE2 25 g/hl	0	0	0	0	20
MEE2 50 g/hl	0	0	0	0	20
MEE3 10 g/hl	0	0	0	20	20
MEE3 25 g/hl	0	0	0	0	40
MEE3 50 g/hl	0	0	0	0	40

Se poate vedea că probele de referință prezintă o precipitare tartrică la adăugarea a 50 mg/L care este un semn că vinul este instabil.

Acidul metatartric şi una din manoproteinele extrase prin digestie enzimatică sunt capabile să prevină precipitarea până la adăugarea a 125 g/hl.

Celelalte manoproteine extrase prin digestie enzimatică produc rezultate foarte bune din moment ce orice vin care nu are precipitat la o doză de 75 g/hl se consideră a fi stabil.

Manoproteinele extrase la căldură nu au efect chiar şi la doze foarte mari.

2. Determinarea comportării la temperatură joasă.

Acest test pentru comportarea la temperatură joasă implică menținerea probelor la temperatură joasă (-4°C) timp de 6 zile, odată ce ele au fost filtrate printr-o membrană cu pori de 1 μm.

Absența oricărei cristalizări în aceste condiții permite ca vinurile testate să fie considerate stabile.

Rezultatele din tabelul 3 consemnează situația la diferite vinuri albe, roze şi roşii.

*** - cristalizare.

ND - nedeterminat.

0 - cristalizare absentă.

Tabelul 3

Tipul vinului	Referința	Meta acid 10 g/hl	MEC 25 g/hl	MEE1 25 g(hl
Alb 1	***	0	***	0
Alb 2	***	0	***	0
Alb 3	***	ND	***	0
Alb 4	***	ND	***	0
Alb 5	***	ND	***	0
Alb 6	***	ND	***	0
Roz 1	***	ND	***	0
Roz 2	***	0	***	0
Roşu 1	***	***	***	0
Roşu 2	***	***	***	0
Roşu 3	***	***	***	0

De notat că manoproteinele extrase prin digestia enzimatică a pereților celulari de drojdie preîntâmpină formarea de cristale la doza de 25 g/hl.

Rezultatul observației vizuale poate fi de asemenea confirmat prin determinarea distanței de concentrație a potasiului din vinuri in mg/L înainte şi după răcire, aşa cum se menționează în tabelele 4, 5, 6.

Tabelul 4

Rezultatele obținute cu vinul alb nr. 3.

Manoproteina	0 g/hl	15 g/hl	25 g/hl
MEC	400	350	150
MEE1	400	250	0
MEE2	400	200	0
MEE3	400	300	0

Tabelul 5

Rezultatele obținute cu vinul roz nr. 1.

Modalități diferite	Potasiu, mg/L	Acid tartric (mg/L)
Referința	80	150
MEC 25 g/hl	30	50
MEE1 25 g/hl	0	0

Rezultatele obținute la vinurile roşii nr. 1, 2 şi 3 corespund unui vin roşu nerafinat, unui vin roşu rafinat cu gelatină la 10 g/hl şi unui vin roşu rafinat cu albuş de ou (egg white) la 10 g/hl.

Tabelul 6

Diferite modalități	Diferența de concentrație a potasiului (mg/L)		
	Vin nerafinat	Vin rafinat cu gelatină	Vin rafinat cu albuş de ou
Referința	90	110	180
Meta acid 15 g/hl	70	70	90
Meta acid 25 g/hl	0	0	0
MEC 15 g/hl	90	110	130
MEC 25 g/hl	50	50	70
MEE1 15 g/hl	30	70	70
MEE1 25 g/hl	0	0	0
Clei 15 g/hl	90	70	140
Clei 25 g/hl	30	50	50

Se va observa că acidul metatartric produce bune rezultate începând de la 25 g/hl.

Manoproteinele extrase prin digestie enzimatică au de asemenea o eficiență la o doză de 25 g/hl, care de asemenea este concentrația care permite o stabilizare completă a celor 3 vinuri: alb, roz şi roşu.

Manoproteinele extrase cu căldură şi gumă arabică în cantități acceptabile nu inhibă total precipitarea tartrului.

3. Durata eficienței.

Mai multe teste au făcut posibil să se compare eficacitatea acidului metatartric şi a manoproteinelor obținute prin digestie enzimatică.

Testul constă în menținerea unei probe tratate la 30°C timp de 10 săptămâni şi apoi expunerea ei la temperatură joasă. Cantitatea de potasiu înainte şi după expunerea la temperatură joasă face posibil să se aprecieze stabilitatea tartrică a vinului tratat cu extract (MEE1) şi instabilitatea vinului de referință sau a vinului tratat cu acid metatartric. Intr-adevăr, în timpul depozitării lui la 30°C, acidul metatartric se hidrolizează şi îşi pierde capacitatea de protecție în plus, el eliberează acidul tartric care sporeşte starea de suprasaturație a vinului şi chiar promovează cristalizarea cremei de tartru.

Diferența de concentrație a potasiului (mg/L) după 6 zile la -4°C

Referința	200
Meta acid 10 g/hl	260
MEE1 25 g/hl	0

II. Stabilizarea proteică.

Stabilitatea proteică a vinurilor se determină cu aşa-numitul test “sub căldură”, care implică expunerea vinului la o temperatură de 80°C timp de 30 min. Turbiditatea se măsoară prin analiza nefelometrică exprimată în unități NTU. Cantitatea de bentonit necesar se corelează astfel încât gradul de turbiditate rămâne mai mic de 2 NTU.

Tabelul 7 ilustrează rezultatele obținute la cele 3 tipuri de vinuri tratate cu diferite manoproteine.

Tabelul 7

Diverse modalități	Turbiditate (NTU)	Cantitatea de bentonit (g/hl)
Vinul de referință 1	12	80
Vin 1+MEC 25 g/hl	12	80
Vin 1+MEE1 25 g/hl	4,4	30
Vin 1+MEE2 25 g/hl	4,2	30

Vin 1+MEE3 25 g/hl	4,3	30
Vinul de referinţă 2	23,1	120
Vin 2+MEC 25 g/hl	23,4	120
Vin 2+MEE1 25 g/hl	10,5	60
Vin 2+MEE2 25 g/hl	10	60
Vinul de referinţă 3	13,8	90
Vin 3+MEC 25 g/hl	14	90
Vin 3+MEE1 25 g/hl	6,2	50
Vin 3+MEE3 25 g/hl	5,8	50

În ceea ce priveşte manoproteinele extrase prin digestie enzimatică, rezultatele arată în mod clar reducerea cantităţii de bentonit necesar pentru obţinerea stabilităţii vinurilor. Reducerea cantităţii de bentonit este de 50%.

În acest mod, calităţile organoleptice sunt afectate într-un grad relativ minor, iar vinurile sunt in special stabilizate pe o perioadă lungă fără alterarea gustului, întrucât manoproteinele extrase prin digestie enzimatică sunt neutre ca gust.

Testele realizate arată în totalitate avantajul conferit de manoproteinele extrase prin digestie enzimatică, atât în ce priveşte inhibarea sărurilor de tartru, cât şi în ce priveşte stabilizarea proteică a vinurilor albe, şi aceasta folosind cantităţi mici.

Acum devine convenabil să se acorde în continuare atenţie manoproteinelor extrase prin digestie enzimatică pentru a ilustra fracţia susceptibilă de a fi cea mai eficientă, atât în ce priveşte sărurile tartrice, cât şi referitor la stabilizarea proteică.

În prealabil, compoziţia preparatelor de manoproteine extrase cu căldură şi prin metoda enzimatică poate fi comparată în mod direct. Din tabelul 8 se va observa că manoproteinele obţinute prin digestie enzimatică au un conţinut proteic distinct mai inalt.

Tabelul 8

Manoproteine	% proteine	% polizaharide	% manoză	% glucoză
extrase cu căldură	4.2	93,8	92	8
extrase enzimatic	15	83,2	100	0

Conţinutul de proteine se determină prin metoda BRADFORD (1976). Conţinutul de polizaharide se determină prin metoda cu fenol sulfuric (MONTREUIL şi SPIK, 1963).

Compoziţia glucidă hidrolizabilă a porţiunii de polizaharidă se determină prin cromatografie în faza gazoasă a monozaharidelor eliberate prin hidroliza cu acid trifluoracetic şi derivate prin sililare (LLAUBERES, 1988).

Preparatele de manoproteine extrase cu căldură (MEC) şi manoproteine extrase pe cale enzimatică (MEE) se analizează în detaliu prin electroforeză cu gel de poliacrilamidă în condiţii denaturate (SDS PAGE) permiţând o separare moleculară, ale cărei rezultate sunt redate in tabelul 9.

Tabelul 9

Greutatea moleculară în KDa (kilodalton)

MEC	MEE
77,8	77,8
70	-
44,1	44,1
-	41,6
35,2	35,2
31,8	31,8
-	30,3
27,5	27,5
25,2	25,2
23,2	23,2
21,3	21,3
19,8	19,8
18,4	18,4
17,2	17,2
16	16

15,2	15,2

Se poate observa absenţa proteinelor la 70 KD în MEE şi absenţa proteinelor la 30.3 KDa şi 41,6 KDa in MEC.

Proteinele specifice in MEE sunt apoi izolate prin distilare fracţionată.

Primul test: Cromatografie cu DEAE sefaroză.

Extrasul MEE brut (100 mg) se solubilizeză în 1 ml de tampon cu fostat având pH=8,0.

Coloana DEAE se spală şi apoi se eluează, în faze, cu NaCl 0,25 M/L. Se colectează 3 ml de fracţii, iar proteinele se determină prin măsurarea absorbţiei la 280 nm. Fracţiile care corespund celor 3 picuri sunt colectate, dializate in contra apei şi liofilizate (conform fig. 4).

Se adaugă 25 g/hl la un vin care este apoi supus unui test caloric pentru a determina capacitatea de stabilizare proteică. Se măsoară turbiditatea în NTU. Rezultatele sunt specificate in fig. 5.

Se va observa capacitatea de stabilizare proteică a fracţiei eluate cu NaCl (0,25 M/L) şi efectul slab al fracţiei nereţinute (FNR) şi al fracţiei cu 0,5 M/L .

Este posibil să se determine conţinutul de proteină şi polizaharidă al MEE şi al fiecăreia din fracţiile eluate.

Aşa cum se poate vedea din tabelul 10 fracţia activă la 0,25 M/L conţine 6% proteină, 78% polizaharidă, iar randamentul său de extracţie este de 60%.

Tabelul 10

	Randament (%)	Proteine (%)	Polizaharide (%)
FNR	25	12	86
0,25 M/L	60	16	78
0,5 M/L	15	16	81

Este astfel necesar să se purifice fracţia de 0,25 M/L NaCl prin cromatografie de afinitate cu ajutorul produsului concanavalin A (Con A), o lectină care se leagă într-un mod reversibil cu moleculele ce cuprind reziduuri de α-D manopiranozil şi α-D glucopiranozil.

Este astfel posibil să se separe proteinele şi manoproteinele din această fracţie specifică de 0,25 M/L NaCl.

Extractul cu 0,25 M/L NaCl (60 mg) se solubilizează într-o soluţie-tampon de citrat cu pH=5 şi se depozitează într-o coloană cu sefaroză Con A.

După spălarea cu soluţia-tampon pentru eluarea proteinelor lotul de compuşi se supune acţiunii unei soluţii α-D manozidă de 0,5 M/L.

Se eluează manoproteinele din gel. Se colectează 3 ml de fracţii, iar analiza prin absorbţie la 280 nm produce rezultate ilustrate de curba din fig. 6.

Se colectează, dializează contra apei şi se liofilizează fracţiile ce corespund fiecărui pic.

Fiecare fracţie se adaugă pentru a produce o cantitate de 25 g/hl.

Testul sub căldură dă rezultatele din fig. 7.

Fracţia reţinută se eluează cu α-D-manozidă de 0,5 M/L.

Această fracţie împreună cu altele se măsoară pentru a determina proteinele şi polizaharidele (tab. 11).

Tabelul 11

	Randament (%)	Proteine (%)	Polizaharide (%)
DEAE (0,25 M/L)	60	16	78
Con A (FNR)	45	20	21
Con A (FR)	15	8	90

Fracţia activă reprezintă 15% de MEE.

Această fracţie cuprinde 8% proteine şi 90% manoză.

Este posibil ca mai sus să se realizeze o electroforeză cu gel (SDS PAGE), care ilustrează că manoproteina responsabilă de stabilitatea proteică a vinurilor albe are o masă moleculară de 31,8 KDa sau MP32 (tab. 12). Aceasta este singura proteină a cărei concentraţie creşte în timpul purificării.

Tabelul 12

Masa moleculară, KDa		
MEE	DEAE (0,25 M/L)	Con A (FR)
77,8	77,8	
	53	
44,1	44,1	
41,6		
35,2	35,2	

31,8	31,8	31,8
30,3		
27,5		
25,2		
23,2		
21,3		
19,8	19,8	19,8
18,4	18,4	
17,2	17,2	17,2
16	16	16
16,2	15,2	15,2

Electroforeza capilară confirmă că MR32 este prezent în proporție de 2% în MEC şi de 14% în MEE, conform fig. 9.

În ceea ce priveşte stabilizarea tartrică, manoproteinele se separă prin cromatografie lichidă sub presiune înaltă pentru separare moleculară conform dimensiunii lor în două fracții care se dializează contra apei şi se liofilizează.

Fracțiile obținute P1 şi P2 se adaugă la un vin alb în cantități diferite. Vinurile tratate se supun unui test la rece, iar concentrarea în potasiu face posibilă estimarea cristalizării tartrice.

După analiză se va observa că MEE inhibă cristalizarea tartratului de potasiu de la 15 g/hl. Prima fracție P1 nu reuşeşte să inhibe această cristalizare, iar în contrast, fracția P2 permite stabilizarea tartrică la o cantitate de 5 g/hl.

Analiza proteinelor şi polizaharidelor conținute în diferite fracții dă următoarele rezultate:

	Proteine (%)	Polizaharide (%)
MEE	15	83
P1	5.3	84,5
P2	8.7	90,3

Fracția P2 care permite stabilizarea tartrică se purifică prin cromatografie de afinitate cu ajutorul concanavalinului (Con A) în două fracții, una fiind o fracție reținută (FR) şi cealaltă, nereținută (FNR) peste lectină, cele două fracții fiind colectate, dializate şi liofilizate.

După adăugare în cantități diferite la un vin, se confirmă că fracția nereținută (FNR) nu contribuie la inhibarea cristalizării sărurilor acidului tartric.

Fracția reținută (FR) face posibil să prevină cristalizarea la un volum de 1,25 g/hl.

Compoziția fracțiilor active poate fi analizată repetat.

	Proteine (%)	Polizaharide (%)
P2	8,7	90,3
FR Con A	2,5	97,5
FNR Con A	12	34

Ca urmare fracția activă cuprinde 2,5% proteine şi 97,5% polizaharide.

Apoi este necesar să se determine prin electroforeză cu gel substanțele moleculare ale fracțiilor purificare.

Masa moleculară în KDa			
MEE	P1	P2	FR Con A
77,8	77,8		
		53,3	
44,1	44,1		
41,6		41,6	41,6
35,2		35,2	
31,8	31,8	31,8	31,8
30,3	30,3	30,3	
27,5	27,5	27,5	
25,2	25,2	25,2	
23,2		23,2	
21,3		21,3	
19,8		19,8	

18,4		18,4	
17,2	17,2	17,2	17,2
16	16	16	
15,2	15,2	15,2	15,2

Fracția activă conține astfel numai patru manoproteine a căror masă moleculară este 41,6; 31,8; 17,2; 15,2 KDa.

Singura proteină care crește în concentrație este cea de 41,6 KDa. Ca urmare, aceasta este o manoproteină responsabilă de stabilizarea tartrică.

Această moleculă poate totuşi fi extrasă numai şi exclusiv din pereții celulari ai drojdiilor printr-un compus de gluconază β-1-3 şi β-1-6.

Cele de mai sus fac posibilă explicarea faptului de ce manoproteinele extrase prin digestie enzimatică au această capacitate dublă de stabilizare a vinurilor şi de ce ele prezintă un interes atât de mare, avand in vedere că substanțele folosite în acest procedeu au fost deja aprobate de autoritățile care se ocupă de acest sector alimentar.

(57) Revendicări:

1. Manoproteine, obținute prin extragere din pereții celulari ai drojdiilor, **caracterizate prin aceea că** au un pic caracteristic obținut la analiza prin cromatografie lichidă la presiune înaltă de separare moleculară, un pic caracteristic obținut prin electroforeză capilară care corespunde manoproteinei de 31 800 Dalton, iar analiza prin electroforeză SDS PAGE arată prezența a două proteine de 41 600 şi 31 800 Dalton.

2. Procedeu de extragere a manoproteinelor care include incubarea pereților celulari ai drojdiilor într-un mediu apos şi colectarea manoproteinelor, **caracterizat prin aceea că** incubarea se efectuează în prezența gluconazelor β-1-3 şi β-1-6, iar colectarea se efectuează prin separarea produselor solide şi concentrarea prin ultrafiltrare a fazei lichide.

3. Procedeu, conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** include suplimentar uscarea produsului obținut prin liofilizare sau atomizare.

4. Procedeu de tratare a vinului pentru stabilizarea lui față de sărurile tartrice şi proteine care include adăugarea la vin a manoproteinelor extrase din pereții celulari ai drojdiilor, **caracterizat prin aceea că** in calitate de manoproteine se utilizează manoproteinele obținute conform revendicării 2.

5. Procedeu, conform revendicării 4, **caracterizat prin aceea că** drojdiile aparțin speciei *Saccharomyces cerevisiae.*

6. Procedeu, conform revendicării 4 sau 5, **caracterizat prin aceea că** cantitatea de manoproteine adăugate la vin este mai mică de 30 g/hl.

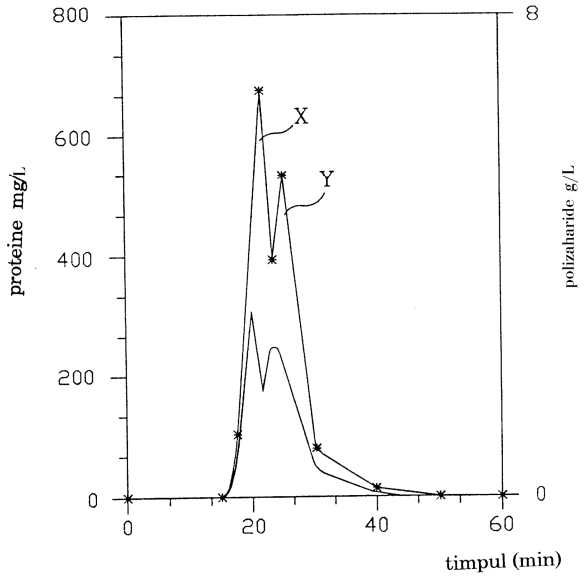
Şef secție: CRASNOVA Nadejda

(56) Referințe bibliografice:

1. Journal International des sciences de la vigne et du vin, vol. 26, no. 4, pag. 239-251
2. Applied and enviromental microbiology, vol. 54, no. 6, pag. 1420-1425
3. Journal International des sciences de la vigne et du vin, vol. 27, no. 1, pag. 13-22
4. Carbohidrate polymers, vol. 23, no. 3, pag. 185-191

Examinator: NADIOJCHINA Natalia

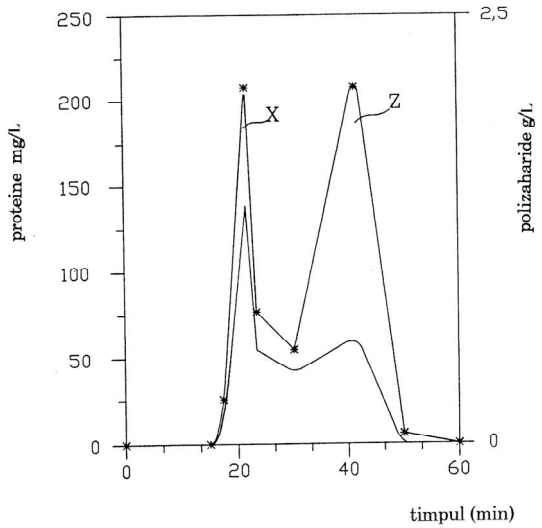
Redactor: ANDRIUȚA Victoria



* Spectrofotometrie la 225 nm (proteine)

. Refractometrie (polizaharide)

Fig. 1



* Spectrofotometrie la 225 nm (proteine)
• Refractometrie (polizaharide)

Fig. 2

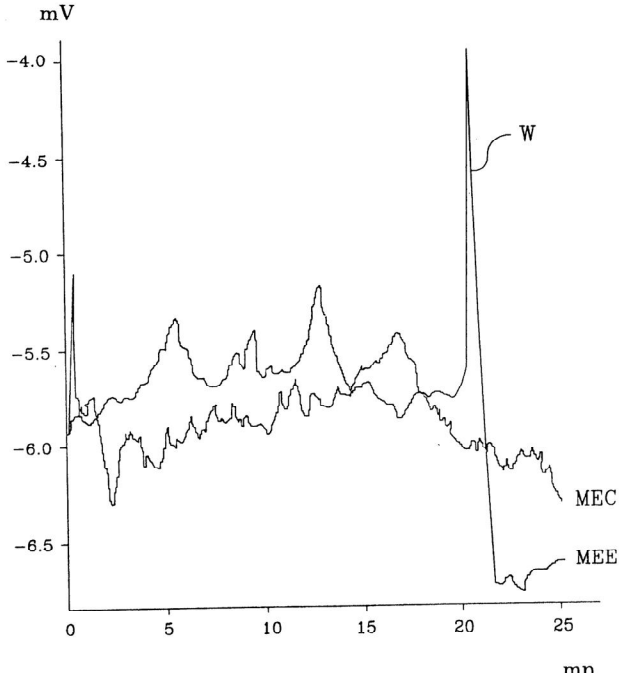


Fig. 3

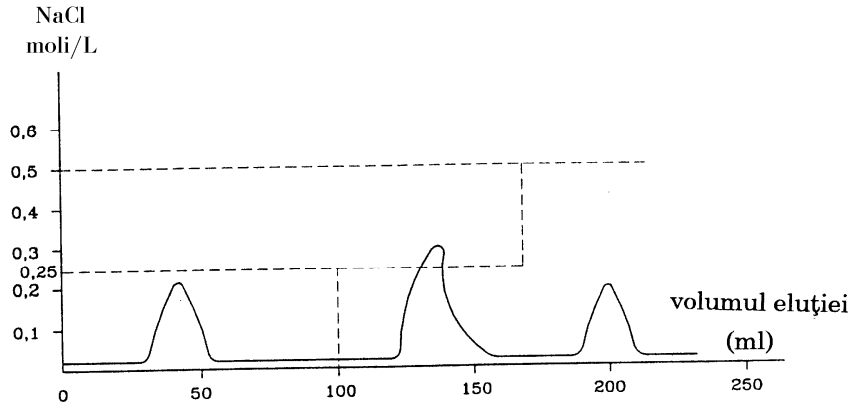

NaCl
moli/L
0,6
0,5
0,4
0,3
0,25
0,2
0,1
volumul eluţiei
(ml)
0
50
100
150
200
250

Fig. 4

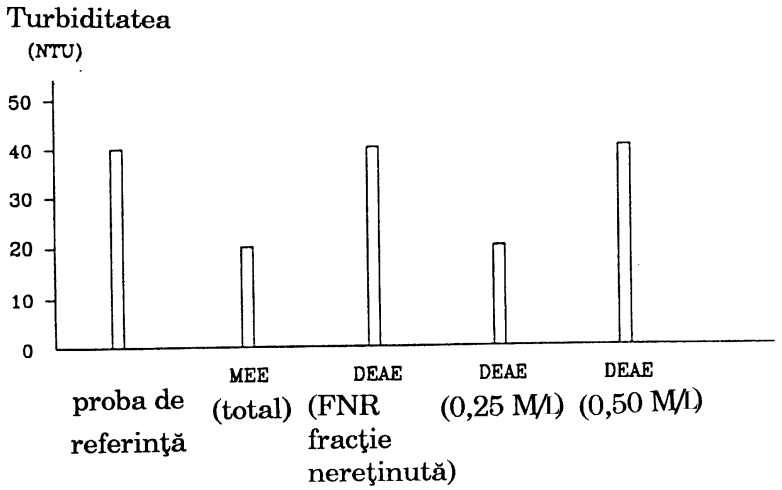

Turbiditatea
(NTU)
50
40
30
20
10
0
proba de referinţă
MEE (total)
DEAE (FNR fracţie nereţinută)
DEAE (0,25 M/l)
DEAE (0,50 M/l)

Fig. 5

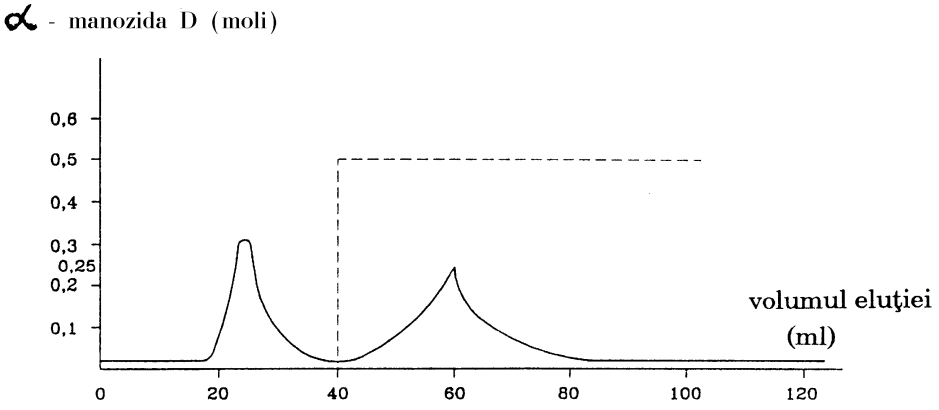

α - manozida D (moli)
0,6
0,5
0,4
0,3
0,25
0,2
0,1
volumul eluţiei
(ml)
0
20
40
60
80
100
120

Fig. 6

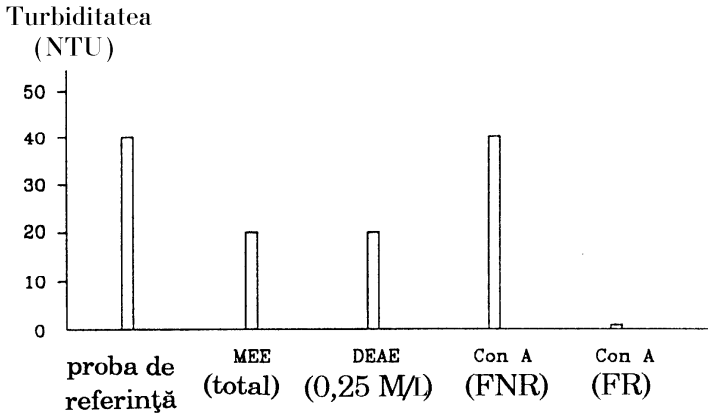


Fig. 7

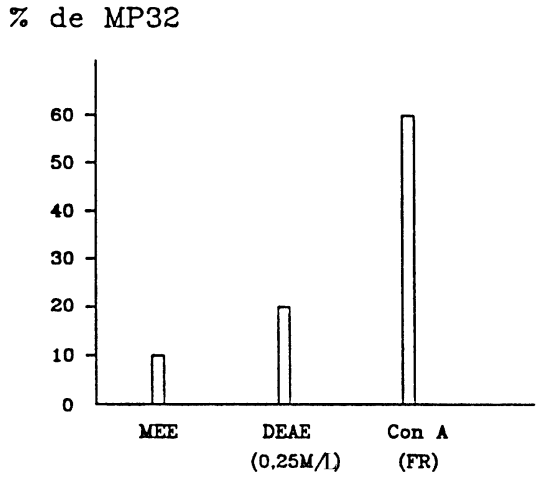


Fig. 8

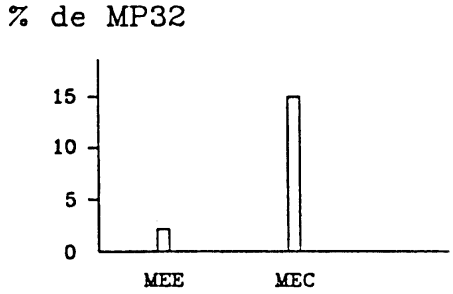


Fig. 9