

UTILIZAÇÃO DE EXTRATOS DE LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae* NA ELABORAÇÃO DE VINHOS ESPUMANTES¹

RIÉVILLION, Jean Philippe Palma²; PIBERNAT, Cristiane Cassales²;
GIULIANI FILHO, João²; AYUB, Marco Antônio Záchia²

RESUMO

O processo de autólise de células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* durante a elaboração de vinhos tipo "champagne" é um dos fatores fundamentais na determinação da qualidade do produto. Estudou-se parâmetros relacionados com a obtenção e utilização no vinho espumante de um extrato de leveduras, de maneira a acelerar ou incrementar o fenômeno de autólise. Testou-se 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 forma a testar o seu efeito. Os métodos físicos de ruptura do envelope celular (pérolas de vidro, sonificador, 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. Comparou-se, então, 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.

Palavras chaves: vinho espumante, extrato de leveduras.

SUMMARY

The process of cell autolysis of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during the elaboration of champagne 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. We studied the effect of temperature in the process of autolysis along with the efficiency of several physical 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. 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.

Key words: sparkling wine, yeast extract.

¹ Recebido para publicação em 06/03/96. Aceito para publicação em 20/12/96.

² Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9.500 - Campus do Vale - Prédio 43212. Caixa Postal 15.090 - CEP 90540-000 Porto Alegre - RS.

1— INTRODUÇÃO

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 (tipo 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") 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.

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, 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 (14).

Mais recentemente, evidenciou-se 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) (26).

Degustações de vinhos realizadas no Instituto de Enologia de Bordeaux que tiveram um aumento do conteúdo de polissacarídeos solúveis demonstraram um efeito positivo

na percepção de redondeza e amplitude do sabor do vinho (25).

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 (14).

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 (11) (37).

1.1 – Efeito da temperatura no processo de autólise

Deve-se diferenciar a influência da temperatura em dois aspectos diferentes e independentes de regulação do fenômeno de autólise de células de leveduras. O primeiro e mais imediato efeito das condições de temperatura, parece influenciar a taxa de autólise, de maneira determinante através de modificações induzidas da membrana celular que facilitam a liberação de compostos intracelulares no meio (4). 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 determinante de vários fatores como estabilidade das enzimas, afinidade da enzima em relação a atiradores e inibidores, reações de competição, afinidade enzima-substrato, velocidade de quebra do complexo enzima-substrato, grau de associação de enzimas multipolipeptídicas (42).

Alguns autores (15) 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 a 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 (11).

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 (13).

1.2 – Efeito do pH no processo de autólise

O pH ótimo de autólise das leveduras é da ordem de 5 (41) (7).

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 (15).

1.3 – Efeito do teor alcoólico no processo de autólise

O grau alcoólico do vinho (em torno de 11% vol) não é considerado um fator inibidor da autólise (11) (28).

1.4 – Características das atividades enzimáticas no processo de autólise

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*, quando determinou-se que a capacidade, de uma cepa mutante desprovida dessas enzimas em degradar um substrato inespecífico com a metil-caseína foi reduzida em 99% (2).

A ruptura das células de leveduras provoca a inativação das proteases A, B e carboxipeptidase Y pela complexação com seus inibidores específicos situados no citosol (35) (36) (18), o que leva a supor que os inibidores das proteases estejam envolvidos na regulação dos eventos proteolíticos (6).

Contudo, a incubação dos extratos celulares em baixo pH (4-5) ativa as proteases, aparentemente, pela hidrólise dos inibidores específicos (22) (35) (36) (18), que é desencadeada por uma pequena quantidade de atividade "livre" da protease A (35) (36) (9).

Em pH 3, não ocorre a completa inibição da protease A (mesmo em alta relação inibidores/protease A), isto permite supor que nessas condições o efeito inter-ativador das proteases tem início; o que não ocorre a pH 5 ou 7, onde uma maior concentração dos inibidores provoca uma completa inativação da protease A (35).

Existe uma ação ativadora interdependente das proteases intracelulares através da inativação das mesmas frente aos inibidores específicos existentes no citosol (Tabela 1) (19).

Contudo, 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 (27). 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, marcadamente a carboxipeptidase Y que aparece como a principal exopeptidase atuando no pH do vinho (23).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* contém ambos endo e exo- β -1,3- e β -1,6-glucanases (1) (5) (34), que contribuem para o processo de autólise (3).

TABELA 1. Inibidores macromoleculares das proteases na levedura.

Inibidores 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) (19), p.30.

Porém, a ação isolada de β -glucanases não provoca a lise de células de leveduras, somente a atividade sinérgica de glucanases e proteases desestruturam, suficientemente, o envelope celular para provocar o fenômeno de autólise (39).

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 (20) (17).

1.5 – Utilização de extratos de leveduras na elaboração de vinhos espumantes

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 (11).

Pode-se inferir que o enriquecimento do vinho espumante em compostos potencialmente qualitativos (aminoácidos, nucleotídeos, glicoproteínas) pela adição de extratos de leveduras trazem um ganho de qualidade ao produto (Tabela 2) (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 firmeza e persistência, além de envelhecerem mais rapidamente (11) (13).

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 (33).

Além disso, a adição de extratos de leveduras, durante a maturação dos vinhos espumantes sobre as leveduras, parece provocar efeitos sobre a cinética do processo de autólise da biomassa.

TABELA 2. 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 a 5% para todas as características menos para a cor.

Fonte: FEUILLAT (1986) (13), p. 13.

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 a 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 (8).

O presente trabalho tem como objetivos:

- Avaliar o efeito da temperatura e do pH do meio na eficiência do processo de obtenção de extratos celulares de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Comparar métodos indutores de ruptura e permeabilização do envelope celular.
- Avaliar a influência do processo de obtenção de extratos de leveduras e do período de atuação do extrato na otimização do processo de maturação de vinhos espumantes.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Cultura e recuperação da biomassa

Utilizaram-se leveduras liofilizadas de vinificação *Saccharomyces cerevisiae*, passíveis de serem utilizadas no processo de elaboração de vinhos tipo "champagne". Cultivou-se as células a 30°C/36 horas em agitação contínua (200 rpm) em uma incubadora-agitadora com uma inoculação inicial de 1g/l. O meio de cultura era composto por extrato de leveduras (5g/l), peptona de carne (10g/l), glicose (20g/l) e água destilada. Nessas condições as células de levedura encontravam-se na fase estacionária de crescimento no final do período.

Centrifugou-se a biomassa no meio de cultura (5000rpm/20min) em uma temperatura de 10°C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em água destilada. Filtrou-se a solução em um suporte de filtração Millipore através de um tamanho de poro de 0,45 μ m em uma pressão de vácuo de 20pol. 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.

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).

Utilizou-se um tampão hidroalcoólico de composição semelhante ao vinho espumante: ácido tartárico (4g/l), ácido málico (3g/l), ácido acético (0,1g/l), sulfato de potássio (0,1g/l), sulfato de magnésio (0,025g/l), etanol (10% vol/vol) e água destilada. Ajustou-se o pH a 3,0 com NaOH 3N.

Utilizou-se um tampão fosfato de pH 7,0 preparado a partir de fosfato de sódio dibásico (0,1M), fosfato de sódio monobásico (0,1M) e cloreto de magnésio (0,01M).

2.2 – Métodos de ruptura ou permeabilização do envelope celular

2.2.1 - 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.

Adicionou-se pérolas de vidro (Glasperlen 0,45x0,50mmØ; 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.

2.2.2 - Sonicador

Utilizou-se um sonicador com "microtip" de 500W de capacidade com uma frequência de saída de 20kHz.

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.

2.2.3 - Moinho de vibração coloidal

Utilizou-se um aparelho Puc-Vikosator (Kolloidtechnik type JV-14/Probst & Class, Westem Gerinany) 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.

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

2.2.4 - Etanol absoluto (FENTON, 1982) (12)

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 numa concentração de 80% (peso de solvente / (peso de solvente + peso da alíquota de células úmidas)) durante 120min. 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 a 30°C durante 24 horas. Centrifugou-se (4000rpm/10min) e recuperou-se o sobrenadante que é o extrato bruto de leveduras.

2.3 – Método de realização dos tratamentos térmicos

As células em suspensão no tampão hidroalcoólico (Item 2.1) 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 20pol 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 forma 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 2.2.1), obtendo-se um segundo extrato de leveduras (extrato 2).

2.4 – Métodos de análise

2.4.1 - Análise da atividade enzimática pelo método de Grzywnowicz (16)

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 (10).

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 absorvância máxima, medidas de razoável precisão são obtidas com um espectrofotômetro. Além disso, o uso de tubos de microcentrifugas como recipiente de reação torna possível o processamento de grande número de amostras simultaneamente.

Misturou-se 50-100µl de extrato bruto de levedura a 650-600µl de tampão fosfato e 100µl de solução de azocaseína 2%, nessa ordem. Incubou-se durante 1h a 37°C. Adicionou-se 800µl de ácido tricloro acético 5% (TCA). Centrifugou-se (4000rpm/5min) e leu-se absorvância do sobrenadante a 336nm (lâmpada deutério) em um espectrofotômetro. Leu-se contra branco preparado na seguinte ordem: TCA, azocaseína, tampão fosfato e extrato bruto de leveduras.

O cálculo é:

$$\frac{\text{Absorvância amostra} - \text{Absorvância branco}}{\text{Volume de amostra}} = U / \text{ml.h}$$

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

2.4.2 - Análise da proteína solúvel (SCOPES, 1994) (38)

Preparou-se a solução de albumina bovina (BSA): diluiu-se 0,02g de BSA em 100ml de hidróxido de sódio 1mM.

Preparou-se a solução A: 0,25g de sulfato de cobre pentahidratado e 0,5g de citrato de sódio em 50ml de água destilada. Preparou-se a solução B: 2g de hidróxido de sódio e 10g carbonato de sódio em 500ml de água. Preparou-se a solução C (51ml): 1ml de solução A e 50ml de solução B. Preparou-se a solução D: solução de Folin-Ciocalteu 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
H ₂ O	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 absorbância em um comprimento de onda de 750nm. A partir da curva padrão, estabeleceu-se a seguinte equação que relaciona a concentração de proteína solúvel da amostra em µg/ml:

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

Onde:

x = concentração da amostra

y = absorbância em 750nm

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 possuía uma quantidade de proteína solúvel que estava dentro dos limites da curva (0-200µg/ml).

2.5 – Classificação dos ensaios

2.5.1 - 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 2.2.

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.

2.5.2 - Ensaios 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 e o pH de atuação das proteases após a quebra das células.

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.

2.5.3 - Ensaios 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.

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 100ml) para permitir as manipulações necessárias (apesar de ser uma concentração de células bem superior à observada em condições industriais).

Adicionou-se às células em maturação, 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 10ml 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:

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

A adição de metabissulfito de potássio (260mg/l) 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 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.

3 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

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 a 5°C/24h pareceu favorecer o tratamento que fez o uso do moinho coloidal. Contudo, o tratamento prévio das células a 30°C/24h 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°C/24h.

Com o pré-tratamento das células a -5°C/24h 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 1).

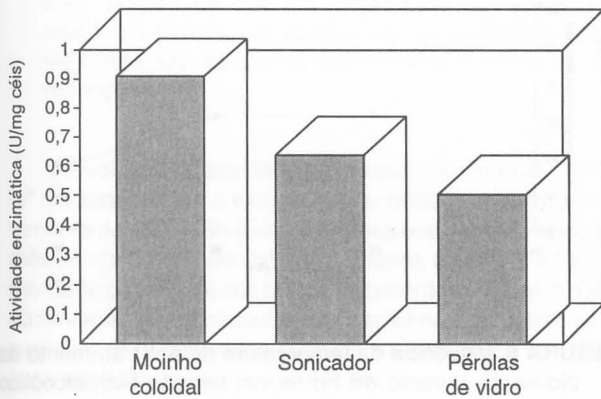


FIGURA 1. Eficiência dos métodos de ruptura e permeabilização do envelope celular de *S. cerevisiae* representada pela liberação de proteases no sobrenadante após um pré-tratamento das células a -5°C/24h em tampão fosfato de pH 7,0. Os resultados representam a média de três repetições.

Com o pré-tratamento das células a 30°C/24h, observou-se que os tratamentos físicos foram mais eficientes na ruptura do envelope celular das células do que o tratamento químico de permeabilização (Figura 2). 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 (12), mesmo que estas permaneçam dentro dos limites celulares durante a permeabilização. O segundo inconveniente é a perda irreversível de compostos intracelulares liberados durante o período de permeabi-

lização 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.

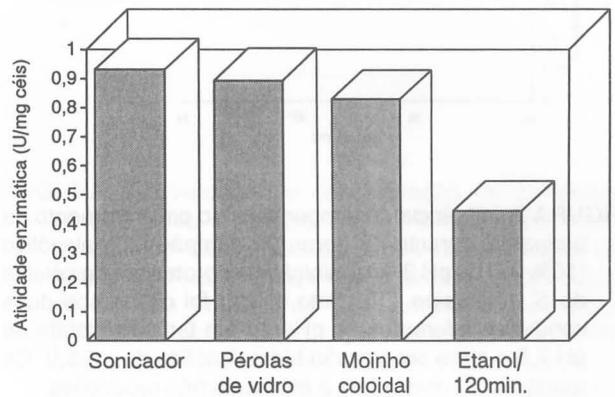


FIGURA 2. Eficiência dos métodos de ruptura e permeabilização do envelope celular de *S. cerevisiae* representada pela liberação de proteases no sobrenadante após um pré-tratamento das células a 30°C/24h em tampão fosfato de pH 7,0. Os resultados representam a média de três repetições.

3.2 — Ensaios para determinar as condições de obtenção do extrato de leveduras

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 (22) (35) (36) (18) que é desencadeada por uma pequena quantidade de atividade "livre" da protease A (35) (36) (9). 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 diluído a ação proteolítica, principalmente a atividade da protease A (40).

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 3), 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 diversos autores (29) (15) (13) (30).

A liberação de compostos nitrogenados no tampão hidroalcoólico, durante o período dos tratamentos técnicos demonstrou uma clara tendência de que as maiores faixas de temperatura provocassem uma liberação mais importante desses elementos (Figura 4) como observaram diversos autores citados no item 1.1. Provavelmente, devido às alterações causadas na membrana plasmática nessas condições, provocando o aumento de sua permeabilidade (4), mas, também, por uma provável atividade proteolítica intensa e breve anterior ao momento da análise, provocando uma hidrólise protéica acentuada (30). Nesse caso, a análise da atividade proteolítica em 48 horas reflete a atividade enzimática residual.

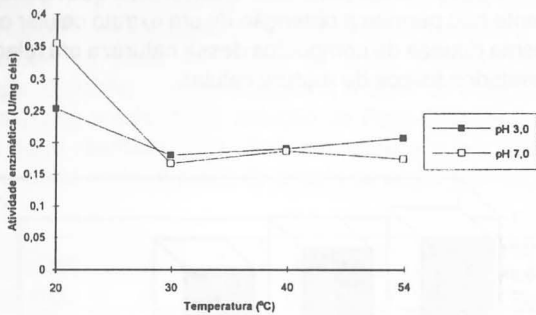


FIGURA 3. Influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10% vol) de pH 3,0 na inibição das proteases de células de *S. cerevisiae*. O extrato celular foi obtido sob duas condições diferentes de pH: um em tampão fosfato de pH 7,0 e outro em tampão hidroalcoólico de pH 3,0. Os resultados representam a média de três repetições.

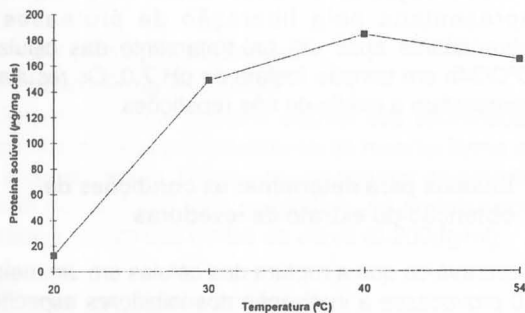


FIGURA 4. Influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10% vol) de pH 3,0 na liberação de compostos nitrogenados intracelulares de baixo peso molecular de células de *S. cerevisiae*. Os resultados representam a média de seis repetições.

Pode-se supor, pelos resultados dos autores citados no item 1.4, que a atividade glucanásica contribua positivamente na permeabilização do envelope celular das células de leveduras, especialmente na faixa de temperatura de 40°C (20).

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 5 e 6).

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 conseqüência da maior atividade enzimática observada nessas condições (Figura 3).

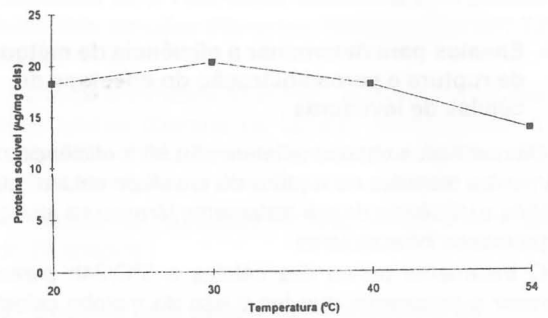


FIGURA 5. Influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10% vol) de pH 3,0 na hidrólise de compostos nitrogenados intracelulares de células de *S. cerevisiae*. O extrato foi obtido em tampão hidroalcoólico de pH 3,0. Os resultados representam a média de três repetições.

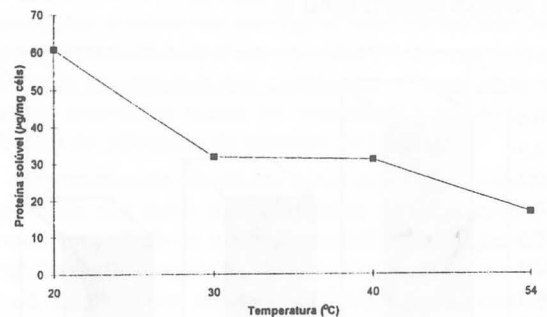


FIGURA 6. Influência da temperatura do pré-tratamento da biomassa durante 48 horas em tampão hidroalcoólico (10% vol) de pH 3,0 na hidrólise de compostos nitrogenados intracelulares de células *S. cerevisiae*. O extrato celular foi obtido em tampão fosfato de pH 7,0. Os resultados representam a média de três repetições.

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.

3.3 – Ensaios para determinar a eficiência da utilização de extratos de leveduras na otimização do processo de maturação de vinhos espumantes

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 (E2O) 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 7). Esse resultado demonstra que no período coberto pelo experimento não ocorre um incremen-

to de atividade proteásica no "vinho espumante" conseqüente a adição de um extrato rico enzimaticamente (E2O).

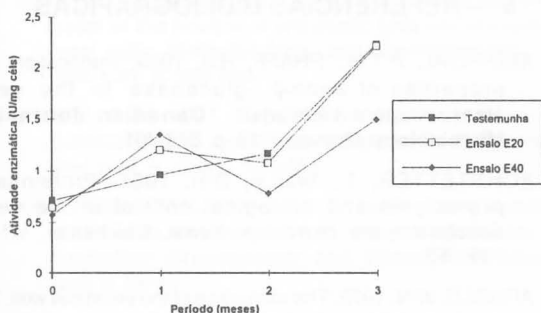


FIGURA 7. Evolução da atividade proteásica no "vinho espumante" em função do tempo de maturação das células de *S. cerevisiae* e dos tratamentos. E20: adição de 5% em volume de um extrato de leveduras (0,025g/ml) obtido com um pré-tratamento a 20°C/48h. E40: adição de 5% em volume de um extrato de leveduras (0,025g/ml) obtido com um pré-tratamento a 40°C/48h. Os resultados representam a média de três repetições.

A evolução da atividade proteásica no "vinho espumante" adicionado com o extrato celular obtido com um pré-tratamento de 40°C/48h (E40) é errática e, a partir do segundo mês de maturação do vinho espumante, é sempre inferior à atividade observada nos outros tratamentos (Figura 7). Essa observação talvez encontre explicação na ação inibitória de peptídeos e aminoácidos específicos presentes em maior concentração no extrato E40 (31).

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.

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 (E4O).

As diferenças entre os teores de proteína solúvel nos diferentes tratamentos mantêm-se relativamente constantes durante todo o período do experimento (13) (Figura 8).

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 extra-celular.

A hidrólise protéica 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 (32).

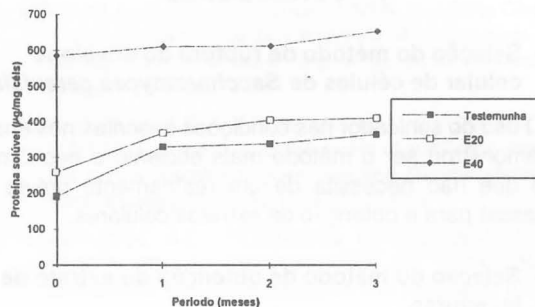


FIGURA 8. Evolução da concentração de compostos nitrogenados de baixo peso molecular no "vinho espumante" em função do tempo de maturação das células de *S. cerevisiae* e dos tratamentos. E20: adição de 5% em volume de um extrato de leveduras (0,025g/ml) obtido com um pré-tratamento a 20°C/48h. E40: adição de 5% em volume de um extrato de leveduras (0,025g/ml) obtido com um pré-tratamento a 40°C/48h. Os resultados representam a média de três repetições.

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 9).

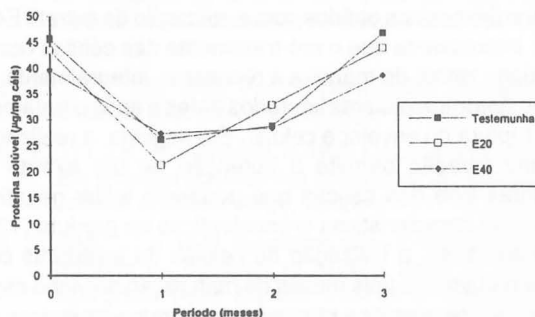


FIGURA 9. Evolução da concentração de compostos nitrogenados intracelulares de baixo peso molecular em função do tempo de maturação das células de *S. cerevisiae* e dos tratamentos. E20: adição de 5% em volume de um extrato de leveduras (0,025g/ml) obtido com um pré-tratamento a 20°C/48h. E40: adição de 5% em volume de um extrato de leveduras (0,025g/ml) obtido com um pré-tratamento a 40°C/48h. Os resultados representam a média de três repetições.

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 alguns autores (21).

4 – CONCLUSÕES

4.1 – 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.

4.2 – 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 (glicoproteínas, sacarídeos, enzimas) para elaboração de vinhos tipo "champagne". 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 E2O 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 E4O.

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 (13).

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 (24).

4.3 – 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, toma-se evidente que a adição de um extrato celular rico em atividade proteásica residual (E2O) 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 (E4O), mesmo que nesse caso a atividade proteásica residual do extrato seja muito menor.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) ABD-EL-AL, A.T.H.; PHAFF, H.J. 1969. Purification and properties of endo- β -glucanase in the yeast *Hanseniaspora valbyensis*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 15, p. 679-701.
- (2) ACHSTETTER, T.; WOLF, D.H. 1985. Proteinases, proteolysis and biological control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, Chichester, v.1, p. 139-157.
- (3) ARNOLD, W.N. 1972. The structure of the yeast cell wall. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 247, p. 1161-1169.
- (4) BABAYAN, T.L.; BEZRUKOV, M.G. 1985. Autolysis in yeasts. *Acta Biotechnologica*, Berlin v. 5, p. 129-136.
- (5) BACON, J.S.D.; GORDON, A.H.; JONES, D.; TAYLOR, I.F.; WEBLEY, D.M. 1970. The separation of β -glucanases produced by *Cytophaga johnsonii* and their role in the lysis of yeast cell walls. *Biochemical Journal*, London, v. 120, p. 67-78.
- (6) 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.
- (7) BÉHALOVÁ, B.; BERAN, K. 1979. Activation of proteolytic enzymes during autolysis of disintegrated baker's yeast. *Folia Microbiologica*, London v. 24, p. 455-461.
- (8) 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.II, p. 547-552.
- (9) 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.
- (10) BEYNON, R.J.; BOND, J.S. 1989. *Proteolytic enzymes, a practical approach*. Oxford, IRL Press. 259 p. (Practical Approach Series).
- (11) 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).
- (12) FENTON, D.M. 1982. Solvent treatment for β -D-galactosidase release from yeast cells. *Enzyme Microbiology Technology*, Surrey, v. 4, p. 229-232.
- (13) 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.
- (14) 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.
- (15) FEUILLAT, M.; CHARPENTIER, C. 1982. Autolysis of yeast in champagne. *American Journal of Enology and Viticulture*, Reedley, v. 33, p. 6-13.

- (16) GRZYWNOWICZ, G.; LOBARZEWSKI, J.; WAWRZKIEWICZ, K.; WOLSKI, T. 1989. Comparative characterization of prateolytic enzymes from *Trichophyton gallinae* and *Trichophyton verrucosum*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxfordshire, v. 27, p. 319-328.
- (17) 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.
- (18) JONES, E.W. 1991. Tackling the pratease problem in *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods in Enzymology**, New York, v. 194, p. 428-453.
- (19) KELLY-TREADWELL P.H. 1988. Protease activity in yeast: its relationship to autolysis and cha a e character. **The Australian Grapegrower and Winemaker**, Adelaide, April, p. 58-66,
- (20) KITAMURA, K. 1982. Re-examination of Zynolysase purification. **Agricultural Biological Chemistry Journal**, Tokio, v. 46, p. 963-969.
- (21) 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.
- (22) 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.
- (23) 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.
- (24) 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.
- (25) 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.
- (26) LUBBERS, S.; VOILLEY, A.; CHARPENTIER, C.; FEUILLAT, M. 1993. Mise en evidence d'interactions entre les macromolecules et les arômes du vin. **Revue Française des OEnologues**, Paris, Cahiers Scientifiques, v. 144, p. 12-18.
- (27) 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.
- (28) MODRA, E.J.; WILLIAMS, P.J. 1988. Are proteases active in wines and juices? **The Australian Grapegrower and Winemaker**, Adelaide, april, p.42-46.
- (29) 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.
- (30) 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**, Reedley, v.29, p.547-554.
- (31) 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**, Reedley, v.30, p.104-107.
- (32) 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.
- (33) RIZZON, L.A.; MIELE, A.; ZANUZ, M.C. 1994. Composição química de alguns vinhos espumantes brasileiros. **Boletim SBCTA**, v.28(1), p.25-32.
- (34) RYAN, E.M.; WARD, O.P. 1985. Study of the effect of β -1,3-glucanase from *Basidiomycete* QM 806 on yeast extract production. **Biotechnology letters**, Kew, v.07, p.409-412.
- (35) 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.
- (36) SAHEKI, T.; HOLZER, H. 1975. Protolytic activities in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.384, p.203-214.
- (37) SILVA, A.; FUMI, M.D.; MONTESISSA, G.; COLOMBI, M.G. & 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.
- (38) SCOPES, R.K. 1994. **Protein purification Principles and practice**. 3.ed. New York, Springer-Verlag, 380p.
- (39) 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.
- (40) 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.
- (41) VOSTI, D.C.; JOSLYN, M.A. 1954. Autolysis of baker's yeast. **Applied Microbiology**, Washington, v.2, p.70-8.
- (42) WHITAKER, J.R. 1972. **Principles of enzymology for the food sciences**. New York. Marcel Dekker Inc. 636p. (Food Sciences).