



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 și procedeu de tratare a
vinului pentru stabilizarea lui față de sărurile tartrice și proteine**

(57) **Rezumat:**

1

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

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

5

10

2

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

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

Revendicări: 6

Figuri: 9

MD 1620 G2

MD 1620 G1

3

Descriere:

Invenția se referă la substanțe biologice și procedee de tratare a vinurilor, în special pentru îmbunătățirea stabilității proteice a vinurilor albe și roze, precum și pentru prevenirea depunerii tartrului în vinurile albe, roze și roșii.

5 Se cunoaște că în comercializarea vinurilor îmbuteliate se cere nu numai ca acestea să fie limpezi în momentul îmbutelierii, dar și ca ele să rămână astfel un anumit timp, în special în 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 și proteică".

10 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 și/sau ca rezultat al îmbogățirii cu tanin din dop.

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

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

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

În ce privește 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 și devine vizibilă în sticle.

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

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

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

A treia soluție implică adăugarea de acid metatartric la vin, acest acid contracarând cristalizarea acizilor tartrici sub influența 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.

35 Soluțiile menționate mai sus nu sunt satisfăcătoare întrucât primele două sunt îndelungate și costisitoare, alterând în plus caracteristicile organoleptice ale vinurilor tratate.

În ce privește a treia soluție, eficiența ei este de scurtă durată, fiind de aceea limitată la vinurile destinate consumului timpuriu, în plus față de faptul că este necesară introducerea în vin a unui compus străin neconținut inițial în el.

40 Cea mai apropiată soluție de esența prezentei invenții se examinează manoproteinele extrase la cald din pereții celulari ai drojdiei de bere aparținând speciei *Saccharomyces cerevisiae* care au un efect inhibitor asupra cristalizării sărurilor tartrice [4].

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

Eficacitatea preparatelor produse la testarea lor într-un mediu model nu a fost încă verificată relativ la majoritatea vinurilor. În plus, prepararea manoproteinelor în modul descris mai sus nu aduce nici o contribuție la îmbunătățiri în ce privește instabilitatea vinurilor albe.

50 Obiectul invenției este de a asigura tratarea vinurilor albe, roșii sau roze pentru a le stabili în ce privește precipitatele tartrice și proteice cu un efect pe termen suficient de lung, care să fie considerat permanent. În plus, tratamentul prevede adăugarea unei substanțe biologice, obținute printr-un procedeu conform invenției, adică introducerea unei substanțe permise de legile de control al vinurilor, numită substanță biologică, neavând miros și fiind complet solubilă în vin.

55 Conform invenției, procedul de tratare a vinului pentru stabilizarea lui față de sărurile tartrice și proteice include adăugarea la vin a manoproteinelor extrase din pereții celulari ai drojdiilor unde în calitate de manoproteine se utilizează manoproteinele obținute conform procedurii de extragere a manoproteinelor propuse.

MD 1620 G2

4

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 și β -1-6.

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

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

10 Procedeu conform invenției se caracterizează și prin aceea că gluconaza β este de tipul β -1-3 și β -1-6.

Invenția mai prevede și manoproteine obținute prin procedeul de mai sus, care au un pic caracteristic obținut la analiza prin cromatografie lichidă la presiune înaltă de separare moleculară, un pic caracteristic obținut prin electroforeza capilară, care corespunde manoproteinei de 31800 Dalton, iar analiza prin electroforeză SDS PAGE arată prezența a două proteine de 41600 și 31800 Dalton.

15 Se dau mai jos exemple de realizare a invenției în legătură și cu figurile 1-9, care reprezintă:

- fig. 1, cromatograma înregistrată într-o operație de cromatografie, referitoare la separarea de manoproteine extrase prin digestie enzimatică;

- fig. 2, cromatograma manoproteinelor extrase la căldură;

20 - fig. 3, grafic obținut prin electroforeză capilară a manoproteinelor extrase prin digestie enzimatică (MEE), comparat cu graficul manoproteinelor extrase prin digestie cu căldură (MEC);

- fig. 4, fracții de proteine obținute prin eluție cu clorură de sodiu;

- fig. 5, indicele de turbiditate (NTU) pentru vinuri de referință și pentru vinuri tratate cu diverse fracții;

- fig. 6, fracții de proteine obținute prin eluție cu α -D-manosidă;

- fig. 7, indicele de turbiditate (NTU) pentru vinuri de referință și vinuri tratate cu diverse fracții;

25 - fig. 8, comparație a concentrației de MP 32 în diverse fracții;

- fig. 9, procentul de MP 32 în MEC și MEE.

Procedeu conform invenției se realizează conform exemplului specific menționat în cele ce urmează.

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

30 Acest preparat cuprinde activități de exo- β -(1-3)-gluconază, endo- β -(1-3)-gluconază și exo- β -(1-6)-gluconază.

Ulterior se separă materialul solid.

Se concentrează faza lichidă, în special prin ultrafiltrare.

35 Masa uscată a produsului corespunde substanțial cu 50% din masa pereților celulari introduși inițial în preparat.

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

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

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

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

45 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 în graficul din fig. 2.

Procedeu conform invenției permite extracția și conservarea unei manoproteine specifice.

50 Pe de altă parte, fiind analizate prin electroforeza capilară în condiții de liniște 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 în 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 aparținând speciilor *Saccharomyces cerevisiae*, denumite "MEE" pe de o parte asupra stabilizării tartrice și asupra stabilizării proteice, pe de altă parte.

55 1. Stabilizarea tartrică.

Se cunosc două tipuri de teste:

1. Determinarea indicelui de stabilitate tartrică.

MD 1620 G2

5

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

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

- 5 Estimarea cristalizării se face vizual sau determinând, prin fotometrie cu flacără, diferența de concentrație a potasiului în vinul filtrat înainte și după trecerea la condiții 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 în mediul model.

- 10 Rezultatele testului sunt date mai jos, bazându-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.

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

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

Rezultatele din tabelul 1 ilustrează diferențele de concentrație (mg/L) ale probelor înainte și după răcire.

Tabelul 1

HTP mg/100 ml	0	50	75	100	125
Proba de referință	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

20

Se poate vedea că precipitarea bitartratului de potasiu în mediul sintetic se inhibă complet de acidul metatartric dar și de către manoproteinele extrase prin acțiune enzimatică, precum și că eficiența, la doze identice, este ușor mai scăzută.

Testul cu un vin alb.

- 25 Tabelul 2 ilustrează rezultatele obținute cu acidul metatartric, manoproteinele extrase cu căldură și manoproteinele extrase prin digestie enzimatică.

Tabelul 2

HTP mg/100 ml	0	50	75	100	125
Proba de referință	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

MD 1620 G2

6

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.

5 Acidul metatartric și 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 și la doze foarte mari.

2. Determinarea comportării la temperatură joasă.

10 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 și roșii.

*** - cristalizare.

15 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
Roșu 1	***	***	***	0
Roșu 2	***	***	***	0
Roșu 3	***	***	***	0

20 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 în mg/L înainte și după răcire, așa cum se menționează în tabelele 4, 5, 6.

Tabelul 4

25 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.

30

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

MD 1620 G2

7

Rezultatele obținute la vinurile roșii nr. 1, 2 și 3 corespund unui vin roșu nerafinat, unui vin roșu rafinat cu gelatină la 10 g/hl și unui vin roșu rafinat cu albuș de ou (egg white) la 10 g/hl.

5

10

Tabelul 6

Diferite modalități	Diferența de concentrație a potasiului (mg/L)		
	Vin nerafinat	Vin rafinat cu gelatină	Vin rafinat cu albuș 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

15

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 și roșu.

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

20

3. Durata eficienței.

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

25

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

30

II. Stabilizarea proteică.

Stabilitatea proteică a vinurilor se determină cu așa-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.

35

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

MD 1620 G2

8

Vin 1+MEE3 25 g/hl	4,3	30
Vinul de referință 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 referință 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 privește manoproteinele extrase prin digestie enzimatică, rezultatele arată în mod clar reducerea cantității de bentonit necesar pentru obținerea stabilității vinurilor. Reducerea cantității de bentonit este de 50%.

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

- 10 Testele realizate arată în totalitate avantajul conferit de manoproteinele extrase prin digestie enzimatică, atât în ce privește inhibarea sărurilor de tartru, cât și în ce privește stabilizarea proteică a vinurilor albe, și aceasta folosind cantități mici.

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

- 15 În prealabil, compoziția preparatelor de manoproteine extrase cu căldură și prin metoda enzimatică poate fi comparată în mod direct. Din tabelul 8 se va observa că manoproteinele obținute prin digestie enzimatică au un conținut proteic distinct mai înalt.

Tabelul 8

Manoproteine	% proteine	% polizaharide	% manoză	% glucoză
extrase cu căldură	4,2	93,8	92	8
extrase enzimatic	15	83,2	100	0

- 20 Conținutul de proteine se determină prin metoda BRADFORD (1976). Conținutul de polizaharide se determină prin metoda cu fenol sulfuric (MONTREUIL și SPIK, 1963).

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

- 25 Preparatele de manoproteine extrase cu căldură (MEC) și manoproteine extrase pe cale enzimatică (MEE) se analizează în detaliu prin electroforeză cu gel de poliacrilamidă în condiții denaturate (SDS PAGE) permițând o separare moleculară, ale cărei rezultate sunt redată în 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

MD 1620 G2

9

15,2	15,2
------	------

Se poate observa absența proteinelor la 70 KD în MEE și absența proteinelor la 30.3 KDa și 41,6 KDa în MEC.

Proteinele specifice în MEE sunt apoi izolate prin distilare fracționată.

5 Primul test: Cromatografie cu DEAE sefaroză.

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

Coloana DEAE se spală și apoi se eluează, în faze, cu NaCl 0,25 M/L. Se colectează 3 ml de fracții, iar proteinele se determină prin măsurarea absorbției la 280 nm. Frațiile care corespund celor 3 picuri sunt

10 colectate, dializate în contra apei și 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 în fig. 5.

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

Este posibil să se determine conținutul de proteină și polizaharidă al MEE și al fiecăreia din fracțiile eluate.

15 Așa cum se poate vedea din tabelul 10 fracția activă la 0,25 M/L conține 6% proteină, 78% polizaharidă, iar randamentul său de extracție 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 fracția 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 și α -D glucopiranozil.

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

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

25 După spălarea cu soluția-tampon pentru eluarea proteinelor lotul de compuși se supune acțiunii unei soluții α -D manozidă de 0,5 M/L.

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

Se colectează, dializează în contra apei și se liofilizează fracțiile ce corespund fiecărui pic.

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

Testul sub căldură dă rezultatele din fig. 7.

Fracția reținută se eluează cu α -D-manozidă de 0,5 M/L.

Această fracție împreună cu altele se măsoară pentru a determina proteinele și 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

35 Fracția activă reprezintă 15% de MEE.

Această fracție cuprinde 8% proteine și 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).

40 Aceasta este singura proteină a cărei concentrație crește 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	

MD 1620 G2

10

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 și de 14% în MEE, conform fig. 9.

- 5 În ceea ce privește 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 și se liofilizează.

Fracțiile obținute P1 și 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.

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

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

	Proteine (%)	Polizaharide (%)
MEE	15	83
P1	5,3	84,5
P2	8,7	90,3

- 15 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) și cealaltă, nereținută (FNR) peste lectină, cele două fracții fiind colectate, dializate și 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.

- 20 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 și 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	

MD 1620 G2

11

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 totuși fi extrasă numai și exclusiv din pereții celulari ai drojdiilor printr-un compus de gluconază β -1-3 și 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 și de ce ele prezintă un interes atât de mare, având în 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 și 31 800 Dalton.

2. Procedeu de extragere a manoproteinelor care include incubarea pereților celulari ai drojdiilor într-un mediu apos și colectarea manoproteinelor, **caracterizat prin aceea că** incubarea se efectuează în prezența gluconazelor β -1-3 și β -1-6, iar colectarea se efectuează prin separarea produselor solide și 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 și proteine care include adăugarea la vin a manoproteinelor extrase din pereții celulari ai drojdiilor, **caracterizat prin aceea că** în 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.

Șef secție:

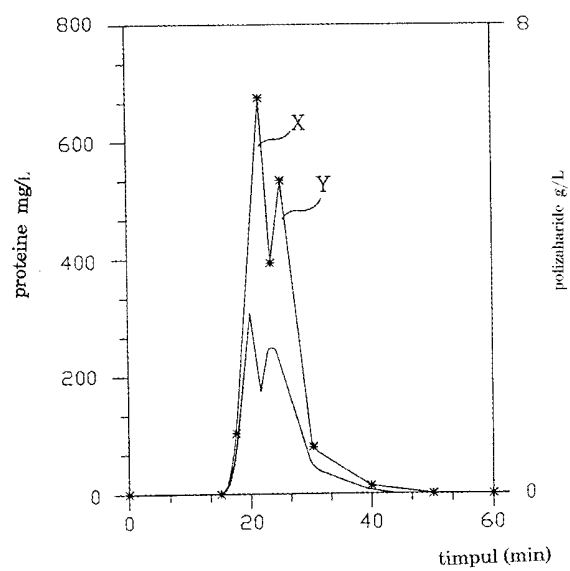
CRASNOVA Nadejda

(56) Referințe bibliografice:

1. Journal International des sciences de la vigne et du vin, NADOLICHEN Natalia, pag. 239-251
2. Applied and environmental microbiology, vol. 54, no. 6, pag. 1420-1425
3. Journal International des sciences de la vigne et du vin, ANTONIUȚA Victoria, pag. 13-22
4. Carbohydrate polymers, vol. 23, no. 3, pag. 185-191

MD 1620 G2

12

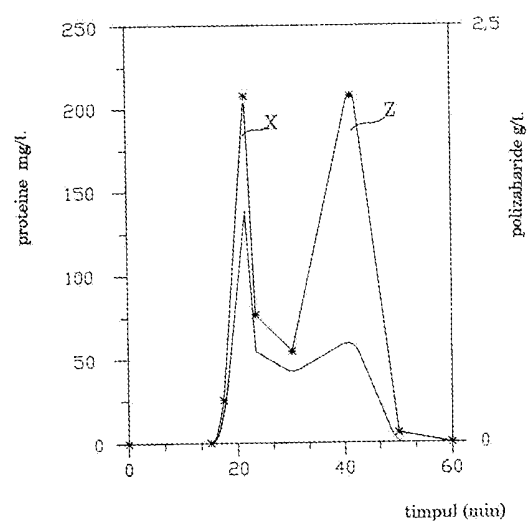


* Spectrofotometric la 225 nm (proteine)
• Refractometric (polizaharide)

Fig. 1

MD 1620 G2

13



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

Fig. 2

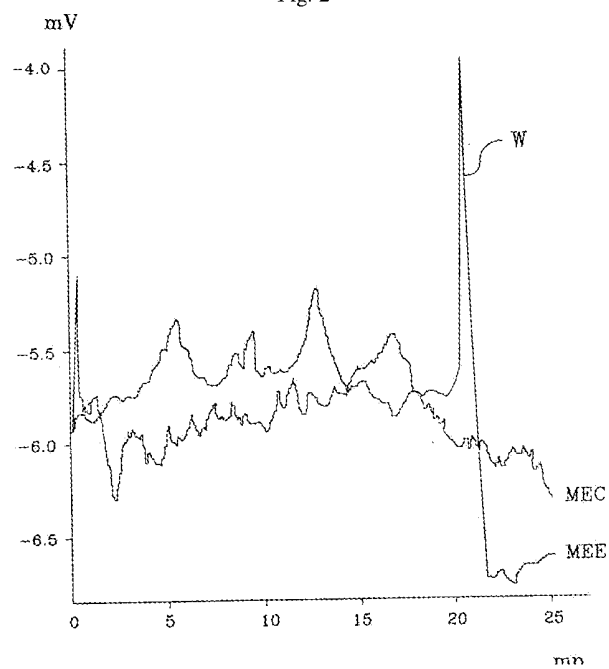


Fig. 3

MD 1620 G2

14

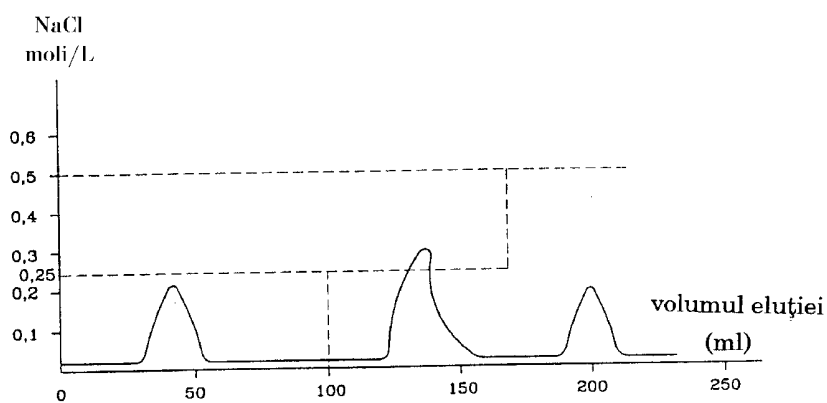


Fig. 4

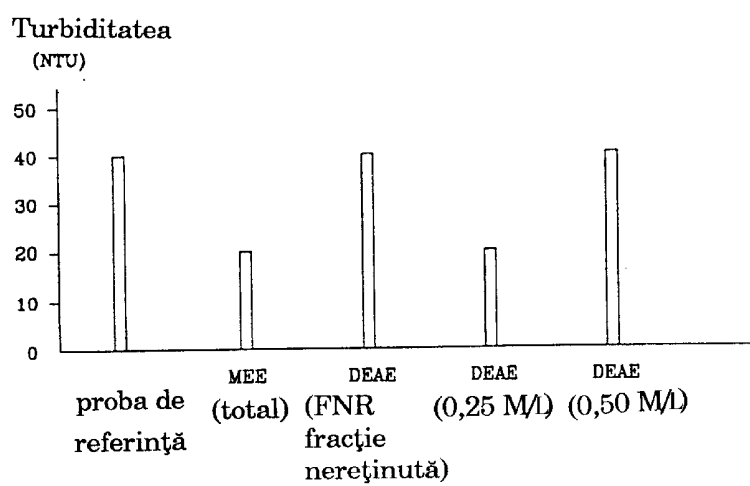
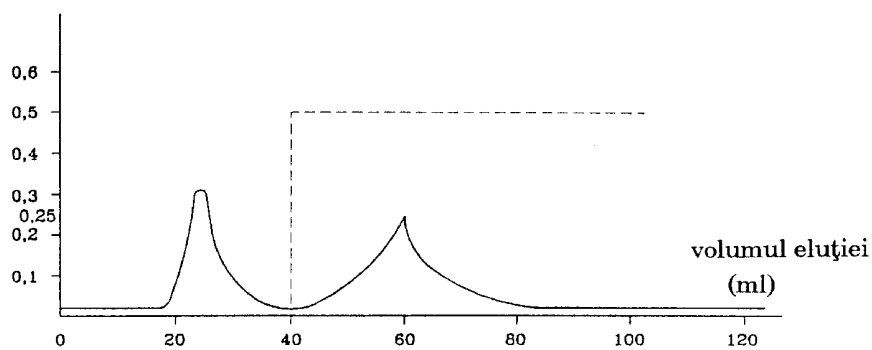


Fig. 5

α - manozida D (moli)



MD 1620 G2

15

Fig. 6

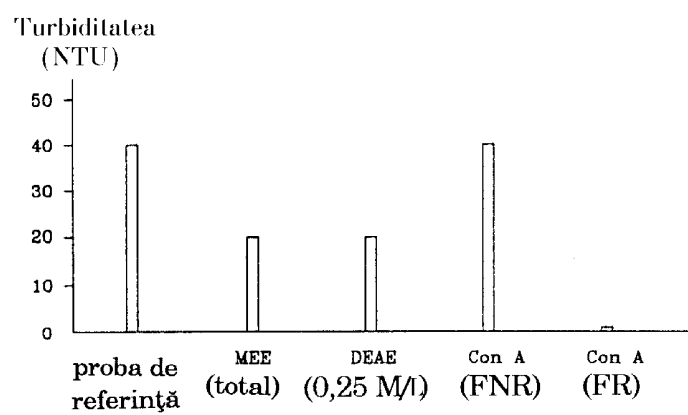


Fig. 7

% de MP32

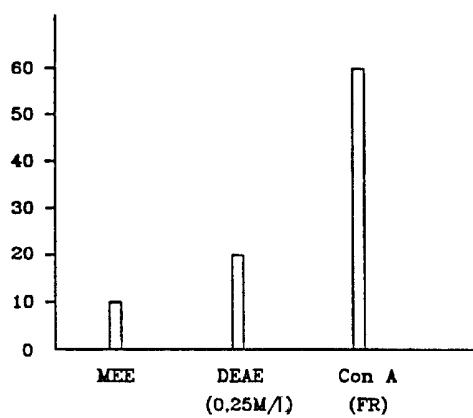
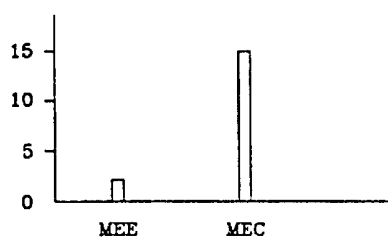


Fig. 8

% de MP32



MD 1620 G2

16

Fig. 9

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: 97-0226	(85) Data fazei naționale PCT: 1997.06.02	
(22) Data depozit: 1995.10.27	(86) Cerere internațională PCT: PCT/FR95/01426, 27.10.1995	
Prioritatea invocată : (31) nr.: 94/13261 32) data : 31.10.1994 33) țara :FR (51) Int. Cl. (7) : C 12 H 1/14, 1/00; C 12 P 21/00 Alți indici de clasificare: (54) Titlul : Procedeu de tratare a vinului pentru stabilizare față de sărurile tartrice și proteice, procedeu de extracție a manoproteinelor folosite la tratarea vinurilor și manoproteină (71) Solicitantul : Faculte d'Oenologie, FR Termeni caracteristici : tratare a vinului pentru stabilizare, extracție a manoproteinelor, manoproteine		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. - 7)		
C 12 H, C 12 P		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
☐ Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data depozitului național reglementat dar după data priorității invocate
A - document care definește statutul general al tehnicii		T - document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria care conține baza invenției
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la data publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)		Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data efectuării de documentare		2000.11.21
Examinatorul		Natalia Nadiojchina

ANEXĂ

RAPORT DE DOCUMENTARE

Informația referitoare la brevete paralele		(21) Nr. depozit:	
Date de identificare ale documentelor citate în raport	Data publicării	Brevete paralele	Data publicării
1	2	3	4

