

Enzimas pectolíticas para maceração, clarificação e revelação de precursores aromáticos de uvas, mostos e vinhos

A adição de enzimas pectolíticas a produtos vitivinícolas é uma prática enológica muito útil, facilitando bastante os trabalhos de vinificação, sendo autorizada pela União Europeia desde 1987.

Neste artigo, faz-se uma revisão bibliográfica das potencialidades do uso destas enzimas, à luz das recomendações da União Europeia e da OIV.

O Regulamento Delegado (UE) n.º 2019/934 [1] enumera, no seu Anexo I, os produtos enológicos autorizados, que podem ser utilizados unicamente “para permitir uma boa vinificação, uma boa conservação ou um bom apuramento dos produtos”. Os auxiliares tecnológicos n.º 7.2, 7.3 e 7.4, referidos no Quadro 2 do Anexo I, constituem 3 enzimas pertencentes à classe das designadas enzimas pectolíticas, cujo uso em enologia já remonta aos anos 70 do século XX, tendo recebido pela primeira vez a aprovação comunitária em 1987, através do Regulamento (CEE) n.º 822/87 do Conselho [2].

A adição de enzimas pectolíticas durante o esmagamento das uvas ou já na fase de mosto melhora a extração, reduz o tempo necessário à clarificação e aumenta o teor em terpenos no vinho. As preparações comerciais de enzimas pectolíticas com alta atividade de pectina liase e baixa atividade de pectina-metilesterase são preferíveis, dado que minimizam a libertação de metanol originário das cadeias de ácido (α -1 \rightarrow 4) poligalacturónico parcialmente metilado, durante a produção de vinho.

Paralelismo entre maturação e vinificação

Para facilitar a compreensão, podemos fazer um paralelismo entre os fenómenos: “maturação da uva” e “vinificação”, pelo menos no que respeita às fases iniciais desta última, que consiste

no seguinte: em ambos os casos – maturação e vinificação – dá-se o amolecimento das paredes das células do bago de uva, com libertação (total ou parcial) do conteúdo celular, nomeadamente compostos aromáticos e compostos fenólicos.

Na fase de maturação da uva, que no hemisfério norte ocorre entre meados de agosto e fins de setembro, consoante a latitude, as paredes das células do bago de uva vão ficando mais tenras, por ação das enzimas pectolíticas endógenas da uva. Progressivamente, vão-se libertando terpenos, pelo que os cachos ficam mais aromáticos. Também ocorrem alterações na textura, nomeadamente uma diminuição da firmeza dos tecidos, provocada pela despolimerização enzimática das paredes celulares.

Na vinificação, o processo é idêntico, mas de forma mais acelerada devido às operações mecânicas de esmagamento das uvas e maceração. Após estas últimas, as enzimas pectolíticas endógenas entram em contacto com os respetivos substratos (pectinas), pelo que se dá a sua hidrólise e portanto, a liquefação das paredes celulares com consequente libertação do conteúdo das células, que acaba por se dissolver no mosto, enriquecendo-o e melhorando-o.

As modificações na composição da parede celular ao longo da maturação são graduais, enquanto na vinificação são bruscas. O que acontece na maturação são progressivas e ligeiras modifica-

ções estruturais nos polissacáridos da parede celular. Por exemplo, podem ocorrer mudanças na massa molecular, na solubilidade, ou no grau de substituição (ou ramificação) de um dado polissacárido da parede, sem que ocorra qualquer grande mudança na quantidade total desse polissacárido.

A ultraestrutura das paredes das células vegetais

À luz do paralelismo referido, e para uma melhor compreensão das transformações a nível celular sofridas pelo bago de uva durante as diversas fases – quer da vinificação quer da maturação – temos de começar por compreender o importante papel que as paredes celulares têm na consistência e rigidez dos tecidos vegetais. Nas figuras 1, 2, 3 e 4 são apresentadas fotografias (obtidas durante observações ao microscópio) de cortes tangenciais de tecidos de quatro espécies vegetais cuja rigidez é crescente: a cebola, a uva, o cânhamo e a cortiça. A cebola (Figura 1) é uma planta pouco rígida, a que correspondem células de paredes delgadas, sem muita pectina, celulose ou hemicelulose. A uva (Figura 2) possui uma rigidez intermédia, a que correspondem células cujas paredes possuem bastante acumulação de pectina, mas pouca acumulação de celulose ou hemicelulose. O cânhamo (Figura 3) é uma planta cujos tecidos possuem elevada rigidez, a que correspondem células com paredes espessas, possuindo pouca pectina, mas bastante celulose, hemicelulose e lenhina. A cortiça (Figura 4) é uma estrutura possuindo elevada rigidez e elasticidade, a que correspondem células com paredes muito espessas, possuindo muita celulose, hemicelulose e suberina.

Daqui se comprehende, por exemplo, que o cânhamo seja utilizado para o fabrico de fibras têxteis, cordas e produtos afins e a cortiça seja um material de propriedades mecânicas notáveis e sobejamente conhecidas e aproveitadas industrialmente.

Atividade enzimática durante a vinificação

Uma boa parte dos trabalhos de vinificação consiste na permeabilização e destruição das paredes celulares do bago de uva, para permitir que o conteúdo citoplasmático seja libertado no mosto. As enzimas pectolíticas necessárias para que, de forma natural, essa tarefa seja concluída existem já na uva em compartimentos celulares diferentes (vacúolos). No entanto, cabe ao enólogo averiguar se é necessário reforçar o teor em enzimas pectolíticas durante a vinificação, podendo decidir reforçar a capacidade enzimática do mosto para promover uma melhor liquefação das paredes celulares da uva, pela adição de enzimas pectolíticas exógenas.

A tarefa de “liquefazer e destruir as paredes celulares” assemelha-se portanto, à destruição de um cofre-forte contendo um tesouro

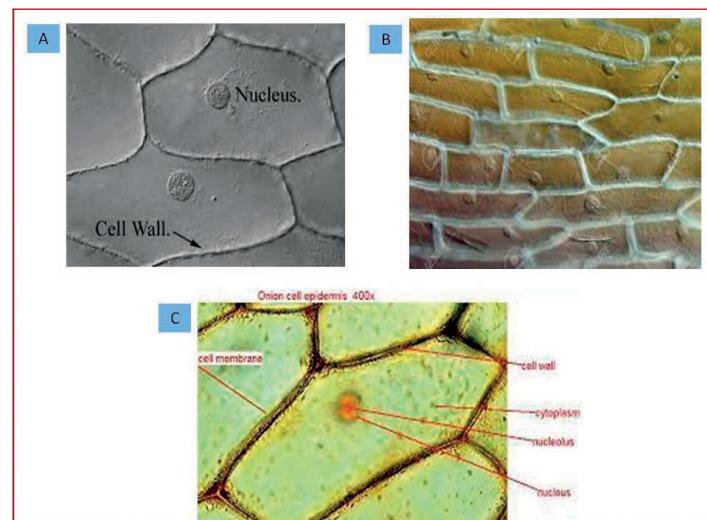


Figura 1 – Fotografias em microscopia ótica, de tecidos de epiderme da cebola. Amplificação de 400 x.
(Extraído de [3])

precioso a diversos níveis: aromático, coloidal e fenólico. Pode ser realizada recorrendo às enzimas naturais da uva ou, por diversas razões, com a ajuda de enzimas exógenas (comerciais), como se referiu anteriormente.

As principais razões para recorrer a enzimas exógenas durante a vinificação são:

- necessidade de acelerar a cinética de maceração (p. ex.: produção de vinhos “primor”; fermentações a baixas temperaturas onde a atividade enzimática endógena é menor e mais lenta);
- propósito de aumentar o teor do vinho num determinado componente que se encontra no interior das células da uva (p. ex.: precursores aromáticos, antocianinas, taninos, ...);
- facilitar a cinética de maceração, no caso de castas de uva em que, reconhecidamente, isso é difícil (p. ex., devido a uma película do bago muito rígida);
- facilitar a cinética de maceração no caso de castas de uva em que, reconhecidamente, são naturalmente ricas em pectina, o que vai dificultar as operações de clarificação. As enzimas pectolíticas exógenas vão reforçar a hidrólise desta pectina em excesso, diminuindo a viscosidade do mosto e facilitando as operações de decantação, clarificação e filtração.

Da classe de enzimas capazes de despolimerizar as paredes celulares, de referir que a uva, de forma endógena, apenas possui enzimas pectolíticas, não possuindo hemicelulases nem celulases. O Regulamento Delegado autoriza a adição exógena destas últimas (n.º de ordem 7.5 e 7.6, no Quadro 2, do Anexo I), mas não nos ocuparemos deste tema no presente artigo.

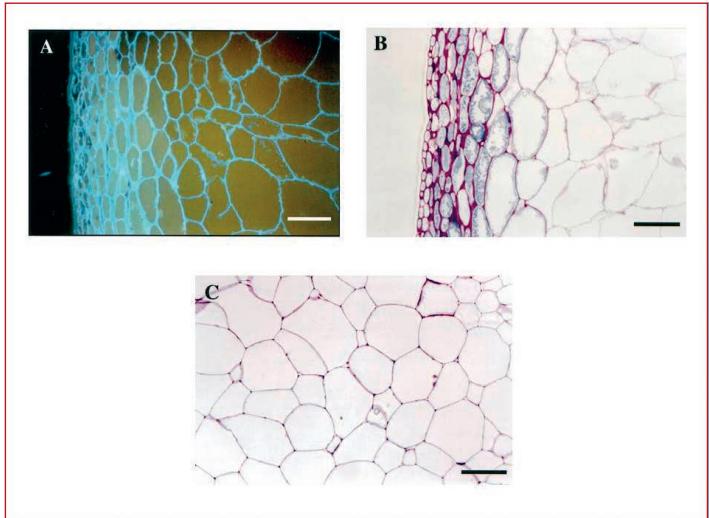


Figura 2 – Fotografias em microscopia ótica, de tecidos do bago de uva madura, mostrando a epiderme (A) e o mesocárpio (B e C). O tamanho da barra representa 100 µm.
 (Extraído de [4])

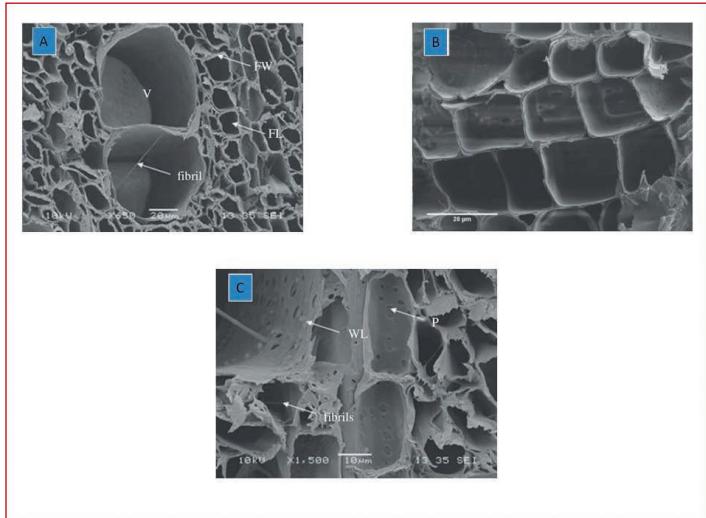


Figura 3 – Fotografias em microscopia eletrônica de varrimento de cortes tangenciais do caule de cânhamo, mostrando as paredes secundárias das células bastante espessadas para garantir consistência aos tecidos. O tamanho da barra representa 20 µm (em A e B) e 10 µm (em C).
 (Extraído de [5])

Tabela 1 – Enzimas pectolíticas autorizadas pelo Reg. Delegado (UE) n.º 2019/934

N.º de ordem	Atividades	Número E	Código de Práticas Enológicas da OIV	Referência da ficha do Codex da OIV (artigo 9.º, n.º 1)	Classificação	Condições e limites de utilização	Categorias de produtos vitivinícolas
7.2	Pectina liase	CE 4.2.2.10	Ficha 2.1.4. (2013) Ficha 2.1.18. (2013) Ficha 3.2.8. (2013) Ficha 3.2.11. (2013)	COEI-1-ACTPLY			(1) vinho (2) vinho novo ainda em fermentação (3) vinho licoroso (4) vinho espumante natural (5) vinho espumante de qualidade (6) vinho espumante de qualidade aromático (7) vinho espumante gaseificado (8) vinho frísante natural (9) vinho frísante gaseificado (10) Mosto de uvas (11) Mosto de uvas parcialmente fermentado (12) Mosto de uvas parcialmente fermentado extraído de uvas passas (13) vinho proveniente de uvas passas (14) vinho de uvas sobreamadurecidas
7.3	Pectina-metilesterase	CE 3.1.1.11	Ficha 2.1.4. (2013) Ficha 2.1.18. (2013) Ficha 3.2.8. (2013) Ficha 3.2.11. (2013)	COEI-1-ACTPME	Auxiliar Tecnológico	Apenas para fins enológicos na - maceração, - clarificação, - estabilização, - filtração e - revelação de precursores aromáticos das uvas.	
7.4	Poli-galacturonase	CE 3.2.1.15	Ficha 2.1.4. (2013) Ficha 2.1.18. (2013) Ficha 3.2.8. (2013) Ficha 3.2.11. (2013)	COEI-1-ACTPGA			

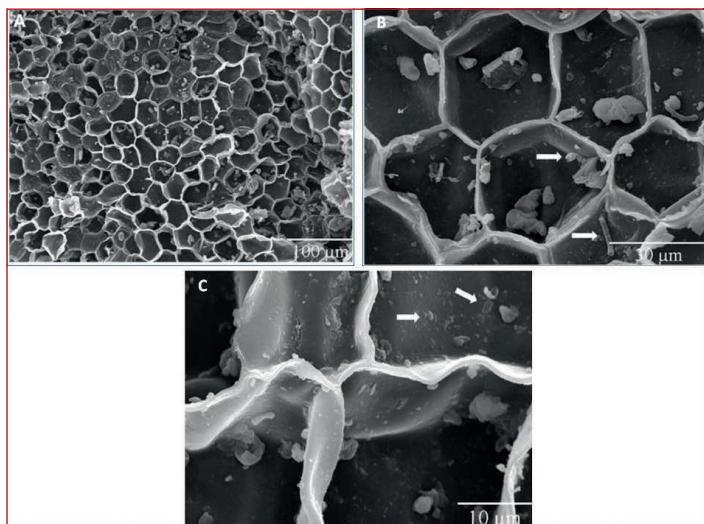


Figura 4 – Fotografias em microscopia eletrónica de varrimento de cortes tangenciais de cortiça, mostrando as paredes secundárias das células bastante espessadas para garantir dureza. O tamanho da barra representa 100 µm (em A), 30 µm (em B) e 10 µm (em C).

(Extraído de [6])

Pectinas e enzimas pectolíticas

As pectinas são polissacáridos naturais de alto peso molecular, extraídos das paredes celulares das plantas superiores. Consistem principalmente em três polissacáridos estruturalmente bem caracterizados: homogalacturonana (HG), rhamnogalacturonana I (RG I) e rhamnogalacturonana II (RG II) [7].

A figura 5 apresenta a estrutura química da homogalacturonana e do seu monómero, o ácido α -D-Galacturónico.

As enzimas pectolíticas são um grupo heterogéneo de enzimas que hidrolisam as substâncias pécticas, presentes de forma endógena nas plantas, mas também podem ser produzidas industrialmente através de microrganismos.

A classificação das enzimas pectolíticas é baseada no seu ataque à estrutura galacturonana da molécula (Figura 5). As enzimas pectolíticas são classificadas em três tipos com base no seu modo de ação: pectina liases, pectina-metilesterases e poligalacturonases [8].

MICR STAB
PROTECT



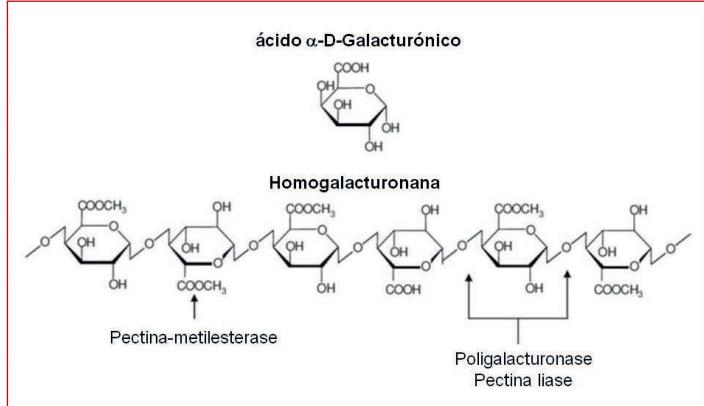


Figura 5 – Estrutura do ácido α -D-Galacturónico e do seu polímero, a homogalacturonana [ácido (α -1 \rightarrow 4) poligalacturónico parcialmente metilado], sendo assinaladas as ligações químicas que são quebradas por cada uma das enzimas pectolíticas referidas neste trabalho.

As enzimas pectolíticas exógenas autorizadas pelo Reg. Delegado (UE) 2019/934

Ao descrever a prática enológica designada “adição de enzimas pectolíticas”, a União Europeia apenas autoriza as enzimas referidas na Tabela 1, nas Categorias de Produtos e nas Condições e Limites referidos na mesma tabela.

A revelação de precursores aromáticos das uvas

Pelo exposto até agora, é relativamente fácil compreender o funcionamento de quatro dos cinco processos enunciados na coluna *Condições e limites de utilização* da Tabela 1: maceração, clarificação, estabilização e filtração.

O que acontece nestes 4 processos é que a adição de enzimas pectolíticas exógenas vai acelerar a hidrólise das pectinas e assim (i) liquefazer as paredes celulares e (ii) diminuir a viscosidade do mosto, facilitando as operações referidas.

No entanto, não é tão fácil compreender o que é e como funciona a operação designada *Revelação dos precursores aromáticos das uvas*, e de que forma as enzimas pectolíticas exógenas podem ajudar nessa tarefa.

Em primeiro lugar, é preciso saber que os compostos aromáticos da uva (sobretudo os terpenos e alguns derivados do isopreno), existem na uva sob a forma glicosilada, isto é, ligada a uma molécula de açúcar, geralmente a glucose. Nesta forma glicosilada (também dita ligada), estes terpenos não possuem qualquer aroma, por não serem voláteis devido ao seu elevado peso molecular. No entanto, as enzimas pectolíticas, ao facilitar a maceração, vão também facilitar o aumento da concentração de precursores

aromáticos glicosilados nas fases pré-fermentativas. Sendo assim, uma outra classe de enzimas existentes naturalmente nas uvas [9], designadas glucosidases, vai poder exercer a sua ação e quebrar a ligação química entre o terpeno e o açúcar, libertando a aglícona volátil, e melhorando o aroma dos vinhos.

A adição de glucosidases exógenas também é autorizada pela União Europeia (n.º de ordem 7.8, no Quadro 2, do Anexo I do Regulamento Delegado), mas não iremos desenvolver este tema agora. Ocupar-nos-emos dele num próximo artigo. 

Paulo J.F. Cameira dos Santos

INIAV, I.P.



Referências Bibliográficas

- [1] Regulamento Delegado (UE) n.º 2019/934, da Comissão, de 12 de março de 2019, que complementa o Regulamento (UE) n.º 1308/2013 no que respeita às práticas enológicas autorizadas.
- [2] Regulamento (CEE) n.º 822/87 do Conselho, de 16 de março de 1987, que estabelece a organização comum do mercado vitivinícola.
- [3] Hall, J.L.; Flowers, T.J. & Roberts, R.M. (1976). *Plant cell structure and metabolism*. Longman (Ed.), London and New York.
- [4] Nunan, K.J.; Sims, I.M.; Bacic, A.; Robinson, S.P. & Fincher, G.B. (1998). Changes in Cell Wall Composition during Ripening of Grape Berries. *Plant Physiol.*, **118**:783-792.
- [5] Jiang, Y.; Lawrence, M.; Ansell, M.P. & Hussain, A. (2018). Cell wall microstructure, pore size distribution and absolute density of hemp shiv. *R. Soc. open sci.*, **5**:171945.
- [6] Miranda, I.; Gominho, J.; Pereira, H. (2013). Cellular structure and chemical composition of cork from the Chinese cork oak (*Quercus variabilis*). *J. Wood Sci.*, **59**:1-9.
- [7] Lecas, M. & Brillonet, J.M. (1994). Cell wall composition of grape berry skins. *Phytochemistry*, **35**:1241-1243.
- [8] Garg, G.; Singh, A.; Kaur, A.; Singh, R.; Kaur, J. & Mahajan, R. (2016). Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech*: 6, article number 47.
- [9] Gunata, Z.; Bitteur, S.; Brillonet, J.M.; Bayonove, C. & Cordonnier, C. (1988). Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydrate Research*, **184**:139-149.