

ISOLAMENTO DE LEVEDURAS PARA BIO-REDUÇÃO DA ACIDEZ VOLÁTIL DE VINHOS: UTILIZAÇÃO COMBINADA DE MEIOS DE CULTURA DIFERENCIAIS E SELETIVOS

Alice VILELA ^{1*}; Carla AMARAL ²; Dorit SCHULLER ³;
Arlete MENDES-FAIA ⁴; Manuela CÔRTE-REAL ³

(1) CQ-VR, Dep. de Biologia e Ambiente, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.
*avimoura@utad.pt
(2) CITAB, Dep. de Biologia e Ambiente, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.
(3) CBMA, Dep. de Biologia, Universidade do Minho, Braga, Portugal.
(4) BioISI, Dep. de Biologia e Ambiente, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

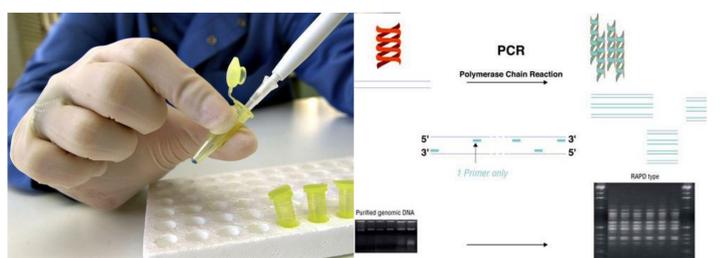


Resumo

A presença de acidez volátil num vinho é um fator determinante na sua qualidade. O ácido acético pode aparecer em diferentes fases do processo de vinificação, desde as uvas até ao produto final, por contaminações microbianas nomeadamente, bactérias acéticas. Os produtores de vinho têm vindo a utilizar um processo de refermentação para diminuir a concentração de ácido acético de vinhos com elevada acidez volátil, o qual consiste em misturar o vinho azedo com uvas recentemente esmagado ou bagaços provenientes do final da fermentação alcoólica, na proporção de 20-30% (v/v). Embora este processo implique custos baixos pode levar a riscos inesperados e prejudiciais sobre os vinhos refermentados [1].

Assim, um desafio para encontrar novas soluções para a redução da acidez volátil elevada, é a seleção de leveduras a partir de processos de refermentação de vinhos azedos. As estirpes mais promissoras podem ser utilizadas em processos de bio-redução da acidez volátil. Para este fim, criamos um protocolo de isolamento com meio de cultura diferencial Wallerstein Nutrient Agar (WL) com o objetivo de selecionar estirpes de leveduras de processos refermentação de vinhos azedos, realizados à escala industrial. Entre os isolados obtidos, 135 foram selecionados, aleatoriamente, com base no padrão de cor e tamanho das colónias, e testados quanto à sua capacidade para consumir o ácido acético, na presença de glicose. Nesta etapa utilizou-se uma versão modificada do meio de cultura seletivo e diferencial de *Zygosaccharomyces bailii* contendo ácido acético e glicose. A caracterização molecular dos isolados mais promissores, foi elaborada utilizando o primer T3B. Confirmou a presença de três estirpes de *Saccharomyces* e uma não-*Saccharomyces*, como previsto pelo meio WL e meio seletivo L-Lisina. Estudos posteriores revelaram que as estirpes de levedura selecionadas por esta abordagem são adequados para a desacidificação de mostos e vinhos com níveis excessivos de acidez volátil [2].

Material e Métodos



Resultados

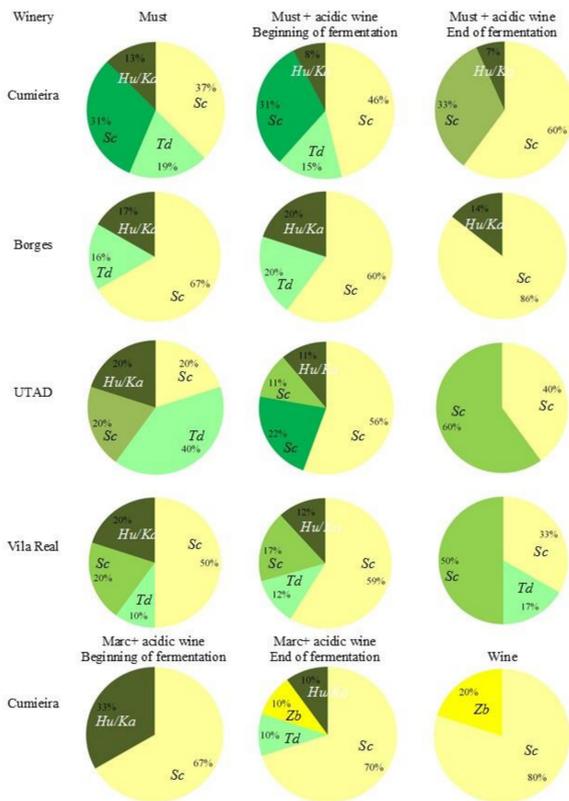


Figura 1 – Percentagens das diferentes colónias obtidas em meio WL, isoladas a partir de processos de refermentação de um vinho azedo (1,36 g/L de ácido acético) à escala industrial. As amostras foram recolhidas em três pontos de amostragem distintos (vinho azedo; vinho + mosto/bagaço no início da refermentação e vinho + mosto/bagaço no final do processo de refermentação). A cor e morfologia das colónias está descrita de acordo com Pallmann et al. [3].

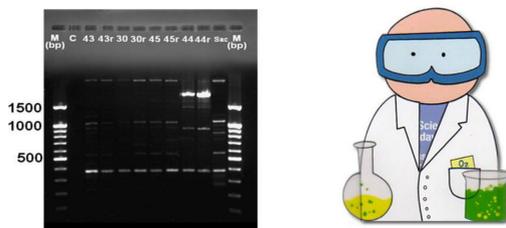


Figura 4 – PCR fingerprinting profile (primer T3B) dos isolados 30C, 43C, 44C e 45C com uma réplica (r). C: controlo (sem DNA); Sac: *S. cerevisiae* PYCC 4072.

Legenda

- Crema (*Saccharomyces cerevisiae* - Sc)
- Crema with a hint of green (*Torulasporea delbrueckii* - Td)
- Crema, small (*Zygosaccharomyces bailii* - Zb)
- Green (*Saccharomyces cerevisiae* - Sc)
- Green, small (*Saccharomyces cerevisiae* - Sc)
- Intense green (*Hanseniaspora uvarum* / *Kloeckera apiculata* - Hu/Ka)

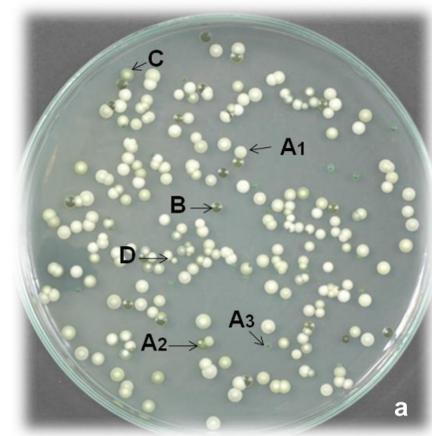


Figura 2 - a – Leveduras isoladas do processo de refermentação em meio WL (diluição de 10⁻³ células/mL). De acordo com Pallmann et al. [3]: colónias de cor creme (A1), verde (A2) e verde/pequenas (A3) são provavelmente isolados de *S. cerevisiae*; colónias de cor verde intenso (B) pertencem a estirpes de *Hanseniaspora uvarum*/*Kloeckera apiculata*; colónias de cor creme com um ponto de verde (C) a *Torulasporea delbrueckii* e colónias pequenas de cor creme (D) serão isolados de *Zygosaccharomyces bailii*.

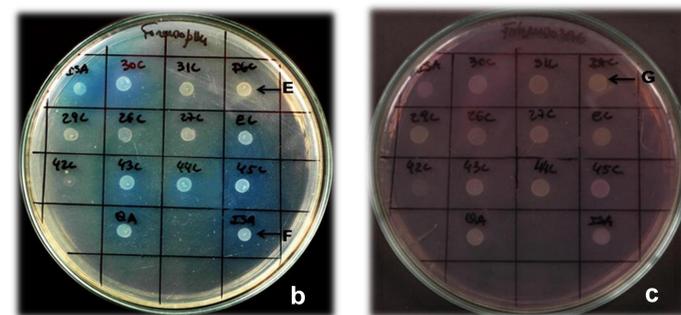


Figura 3 - b – Crescimento da colónia e mudança de cor (devido a alterações no pH) no meio diferencial adaptado de [4] com 0,5% (v/v) de ácido acético, 0,05% (p/v) de glicose e verde de bromocresol (0,005% (p/v)), a pH 4,0, indicando consumo simultâneo de glicose e ácido acético, pelos isolados 30C, 43C, 44C e 45C. E: *S. cerevisiae* PYCC 4072 (controlo negativo); F: *Z. bailii* ISA1307 (controlo positivo).

C - Crescimento da colónia e mudança de cor (devido a alterações no pH) no meio diferencial adaptado de [4] com 0,5% (v/v) ácido acético, 0,5% (p/v) de glicose e 0,005% (p/v) de púrpura de bromocresol, a pH 6,0. A estirpe PYCC 4072 (G) mostra um resultado negativo apresentando uma cor amarela brilhante à volta da colónia

Discussão dos Resultados e Conclusões

- O meio de cultura WL foi utilizado para monitorizar a dinâmica das populações de levedura durante as fermentações Pallmann et al. [3]. No presente estudo um total de 135 leveduras, isoladas a partir de amostras colhidas durante os processos de refermentação de um vinho com altos níveis de acidez volátil, foram selecionadas aleatoriamente, pela sua diversidade de cor e tamanho, em meio WL. Assim, este meio revelou-se útil para realizar uma pesquisa rápida de um elevado número de isolados, diferenciando *Saccharomyces* de não-*Saccharomyces* (*Hanseniaspora uvarum* / *Kloeckera apiculata*, *Torulasporea delbrueckii* e *Zygosaccharomyces bailii*) provenientes de processos de refermentação vínicos (Figuras 1 e 2).
- Dos 135 isolados, quatro (30C, 43C, 45C e 44C), revelaram capacidade para consumir ácido acético na presença de glicose, num meio sólido diferencial adaptado de Shuller et al. [4]. Assim, este meio diferencial mostrou-se adequado e muito útil para um rastreio preliminar de leveduras em relação à sua capacidade de consumir ácido acético e glicose em simultâneo (Figura 3).
- A caracterização molecular dos isolados 30C, 43C, 45C e 44C por PCR fingerprinting com o primer T3B, identificou as três estirpes 30C, 43C e 45C como estirpes de *Saccharomyces* e o isolado 44C como uma estirpe não-*Saccharomyces* (Figura 4).
- O uso de abordagens fenotípicas e moleculares, em conjunto, permitiu a obtenção de resultados inequívocos na identificação de espécies de leveduras presentes nos processos de refermentação. Mais ainda, a capacidade para consumir o ácido acético na presença de glicose foi detetada apenas em quatro isolados de *S. cerevisiae* e numa estirpe não-*Saccharomyces*.

Referências Bibliográficas

- Zoecklein BW, Fugelsang KC, Gump BH, Nury FS (1995) Wine Analysis and Production. Chapman & Hall (Eds.) 1st edn, New York, NY, USA.
- Vilela A, Amaral C, Schuller D, Mendes-Faia A, Corte-Real M. (2015). Combined use of Wallerstein and *Zygosaccharomyces bailii* modified differential media to isolate yeasts for the controlled reduction of volatile acidity of grape musts and wines. Journal of Biotech Research. 6, 43-53.
- Pallmann CL, Brown JA, Olineka TL, Cocolin L, Mills DA, Bisson LF (2001) Use of WL Medium to Profile Native Flora Fermentations. Am J Enol Vitic 52:198-203.
- Schuller D, Corte-Real M, Leão C (2000) A differential medium for the enumeration of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* in wine. J Food Prot 63(11): 1570-1575.
- Schuller D, Valero E, Dequin S, Casal M (2004) Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. FEMS Microbiol Lett 231(1):19-26.