

# AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE DE LEVEDURAS PRESENTES EM VINHOS TINTOS ARMAZENADOS EM BARRICAS DE CARVALHO

Magali Stival Berlesi<sup>1</sup>; Carla Zanelatto<sup>2</sup>; Taís Letícia Bernardi<sup>3</sup>; Patrícia Valente<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Estudante do curso de Ciências Biológicas da UFRGS. Bolsista de Iniciação Científica do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde. E-mail: magali.stival@gmail.com; <sup>2</sup> Biomédica. E-mail: carlazanelatto@feevale.br; <sup>3</sup> Doutoranda do PPGMAA/UFRGS. E-mail: tisetlicia@gmail.com; <sup>4</sup> Professora do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde. E-mail: patricia.valente@ufrgs.br

**Resumo** - O grande desenvolvimento da indústria vinícola brasileira ocorreu na década de 70, quando empresas internacionais se instalaram na Serra Gaúcha. Desde então, as vinícolas brasileiras têm investido na busca da qualidade do produto, procurando competir com os vinhos importados e alcançar o mercado externo. A fim de contribuir com a pureza e autenticidade dos vinhos brasileiros e tendo em vista que muitos aspectos da contaminação microbiana de vinhos precisam ser esclarecidos, evidencia-se a necessidade de distinguir as diferentes cepas de leveduras envolvidas no processo enológico – tanto responsáveis pela fermentação alcoólica quanto as contaminantes. Sabendo que a principal fonte de contaminação são as barricas de envelhecimento da bebida, buscamos identificar leveduras em vinhos tinto (cabernet sauvignon e merlot) envelhecidos em barris em duas vinícolas do Estado do Rio Grande do Sul. Para tanto, foram semeadas amostras do vinho diretamente em ágar YEPG com cloranfenicol, nos volumes de 0,1mL e 1,0mL, sempre em triplicatas. Após, os meios foram incubados a 28°C por uma semana e colônias de leveduras de cada tipo morfológico foram selecionadas, purificadas e armazenadas para posterior identificação. Na primeira vinícola abordada, a média colonial encontrada nas amostras foi de  $9 \times 10^1$  UFC.mL<sup>-1</sup>, das quais foram selecionadas 100 leveduras. A identificação dos micro-organismos está em andamento, bem como o isolamento de leveduras de uma segunda vinícola, da qual já há 20 micro-organismos selecionados. Com os resultados finais deste estudo pretende-se identificar as leveduras presentes no processo enológico e orientar medidas para evitar sua contaminação no caso de leveduras indesejáveis serem encontradas.

**Palavras-chave:** identificação; leveduras; vinho.

## Introdução

O grande desenvolvimento da indústria vinícola brasileira ocorreu na década de 70, quando empresas internacionais (Chandon, Martini & Rossi e Heublein) se instalaram na Serra Gaúcha. Desde então, as vinícolas brasileiras têm investido na busca da qualidade do produto, procurando competir com os vinhos importados e alcançar o mercado externo.

A maturação de alguns vinhos é realizada em barricas de carvalho, tanto francês quanto americano. Esta etapa é a principal responsável pela contaminação microbiana, especialmente por *Dekkera bruxellensis*, hoje considerada como a maior causadora da deterioração de vinhos (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003). Leveduras do gênero *Dekkera/Brettanomyces* são produtoras de fenóis voláteis que conferem sabores desagradáveis (off-flavour) ao vinho (Chatonnet et al., 1992), conhecidos como “estábulo”, “suor de cavalo”, “couro”. Segundo Chatonnet et al. (1992), as barricas de carvalho são nicho ecológico para espécies *Dekkera/Brettanomyces*, o que torna a reutilização das barricas perigosa, já que muitos processos de higienização (queima de enxofre em barris vazios) não são suficientes para

eliminação dessas espécies. Outros trabalhos relataram que o tratamento com água quente e vapor d'água também não são suficientes para eliminar leveduras e bolores aprisionados nas madeiras dos barris.

Na elaboração de vinho, a fermentação alcoólica ocorre na presença de diversas espécies de leveduras e bactérias (principalmente lácticas e acéticas), tornando difícil traçar uma linha entre a atividade fermentativa benéfica e a atividade deteriorante (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003). Por isso, leveduras deteriorantes são procuradas somente na estocagem ou envelhecimento e durante o processo de engarrafamento. No entanto, muitos efeitos deteriorantes ocorrem antes da fermentação, como a produção de acetato de etila por *Pichia anomala* (Plata et al., 2003), ou no início do processo fermentativo, como a produção de acetato por *Kloeckera apiculata/Hanseniaspora uvarum* (Romano et al., 1992).

Com o objetivo de contribuir com a qualidade dos vinhos brasileiros e observando os aspectos práticos de elaboração e envelhecimento, evidencia-se a necessidade de conhecer as diferentes espécies de leveduras envolvidas em ambos os processos. O presente trabalho objetiva identificar leveduras presentes em vinhos tintos (cabernet sauvignon e merlot) provenientes de duas vinícolas do Rio Grande do Sul envelhecidos em barris de madeira.

## Material e Métodos

Alíquotas de 0,1mL e 1,0mL de cada uma das amostras de vinho foram plaqueadas em placas de petri contendo ágar YEPG acrescido de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 28°C por uma semana. O plaqueamento foi realizado em triplicata. De cada placa, as colônias morfológicamente distintas foram selecionadas, purificadas e armazenadas em ágar GYMP inclinado e cobertas por óleo mineral para posterior identificação.

Testes de identificação fenotípico, baseado na fermentação e assimilação de fontes de carbono (replica plate), crescimento à 37°C e crescimento em etanol estão sendo realizados com 25 dos isolados provenientes da primeira vinícola.

Para o teste de fermentação de glicose e crescimento à 37°C, as leveduras foram diluídas em água destilada estéril, em seguida, 100µL da suspensão foi inoculado nos tubos contendo os meios específicos para cada experimento. O teste de fermentação teve duração de 21 dias com leituras realizadas nos dias 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14 e 21, através da produção de dióxido de carbono dentro dos tubos de Durhan. O teste de crescimento à 37°C teve duração de quatro dias, com leitura realizada diariamente analisando a turbidez com o cartão de Wickerham.

O teste de assimilação de fontes de carbono foi realizado com a utilização do replicador (método replica plate). As leveduras foram suspensas em água destilada estéril por 24h, posteriormente 400µL da solução foi inoculado em cada um dos poços do replicador e as placas com as fontes testadas (maltose, xilose, glucitol e galactose) foram “carimbadas” e incubadas à 25°C. O experimento teve duração de três semanas, com leitura feita em cada uma delas.

O teste de crescimento em etanol foi realizado em solução contendo 0,67% YNB e 0,5% etanol, incubado à 25°C.

## Resultados e Discussão

A média colonial encontrada nas amostras da primeira vinícola abordada foi de  $9 \times 10^1$  UFC.mL<sup>-1</sup>, das quais foram selecionadas 100 leveduras. A seleção de micro-organismos da segunda vinícola ainda está sendo realizada, no entanto, já há 20 isolados armazenados.

O teste de fermentação de glicose demonstrou que 100% das leveduras foram capazes de fermentar esse açúcar, sendo assim, novos testes com outros açúcares (galactose, maltose,

xilose) foram testados. Destes, um isolado foi capaz de fermentar galactose e xilose e outros dois isolados fermentaram a maltose.

No teste de crescimento à 37°C, 32% das leveduras testadas foram capazes de crescer à essa temperatura, apresentando diferentes graus de turbidez. No teste de crescimento em etanol, 64% dos isolados testados conseguiram se desenvolver em diferentes graus. Estes isolados serão submetidos a testes de crescimento em concentrações mais elevadas de álcool etílico.

Através da análise da capacidade de assimilação de diferentes fontes de carbono, juntamente com morfologia celular e colonial, serão criados critérios para agrupar as leveduras isoladas como pertencentes ou não ao grupo das leveduras *Saccharomyces*. No caso de serem identificadas linhagens de espécies responsáveis pela deterioração do vinho, medidas para prevenir a contaminação da bebida deverão ser adotadas.

### **Conclusões**

Como resultado obtido dos testes de fermentação realizados, destaca-se a levedura fermentadora de xilose e sua importância como potencial biotecnológico para produção de xilitol ou bioetanol de segunda geração. Em termos de identificação, pelos poucos testes realizados, não se pode chegar a uma conclusão de gênero e espécie dos isolados.

### **Apoio**

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - PIBIC/CNPq

### **Referências**

- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J. N., Pons, M., 1992. The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* 60, 165-178.
- Loureiro, V. & Malfeito-Ferreira, M., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. Review. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 23-50.
- Plata, C., Millán, C., Mauricio, J. C., Ortega, J. M., 2003. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol.* 20, 217-224.
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R., 1992. Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 126-130.