

## CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS GPEpU17 ISOLADAS DO MOSTO DE UVA DA CULTIVAR GOETHE PRIMO URUSSANGA-SC

Paulo Cesar Pereira SOARES<sup>1</sup>, Marlene Guevara dos SANTOS<sup>2</sup>, Gildo Almeida da SILVA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Graduando da UERGS, Bento Gonçalves, RS. Estagiário da Embrapa Uva e Vinho. <sup>2</sup> Profa. Orientadora.

Unidade UERGS Bento Gonçalves, RS, <sup>3</sup> Pesquisador da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS.

E-mails: paulo-soares@uergs.edu.br; marlene-santos@uergs.edu.br; gildo.almeida@embrapa.br.

### Resumo

As leveduras mais empregadas na elaboração de vinhos são do gênero e espécie *Saccharomyces cerevisiae*. A qualidade do vinho não depende apenas da uva, mas também de leveduras selecionadas que possuam aptidão enológica adequada para o processo de vinificação. Este trabalho teve como objetivo caracterizar as leveduras da série GPEpU17 obtidas a partir de bagas de uvas do cultivar Goethe Primo provenientes da Epagri Urussanga-SC. Todas as linhagens foram avaliadas quanto à produção de sulfeto de hidrogênio, velocidade de fermentação, formação de fator killer, sensibilidade a atividade killer e neutralidade. Foram escolhidas linhagens com comportamento distinto para identificação por amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 por PCR e RFLP que não foram identificadas por MALDI-TOF/MS. Os resultados da caracterização das linhagens GPEpU17 mostraram que nenhuma das leveduras da série apresentaram potencial fermentativo, mas, as caracterizadas neutras poderão ser empregadas como culturas mistas junto com *Sacch. cerevisiae* comercial na produção de vinhos.

### INTRODUÇÃO

A vitivinicultura brasileira é uma atividade notável para a sustentabilidade de emprego e grandes empreendimentos no Brasil, onde tem oportunizado o aumento na economia, por meio do turismo e da gastronomia. A Serra Gaúcha é a principal região vitivinícola do país. As leveduras desempenham papel importantíssimo para a elaboração de vinhos, sabe-se que elas são as responsáveis pela conversão do açúcar presente no mosto em álcool, e o resultado deste processo está diretamente relacionado à linhagem de levedura empregada. Dois são os itens básicos para a elaboração de vinhos de qualidade, a matéria-prima, a uva, e o agente transformante, a levedura. Ainda que o mercado viabilize leveduras comerciais importadas para a realização de processos altamente efetivos o uso de leveduras selecionadas isoladas do próprio vinhedo oferece outras vantagens em relação ao uso de leveduras comerciais (SILVA et al., 2008b; LOPES et al., 2007). A utilização de leveduras selecionadas com características desejáveis oferece as seguintes vantagens dentre outras na produção de vinhos; capacidade fermentativa, baixa produção de sulfeto de hidrogênio (da SILVA & SILVA, 1987) e neutralidade ao fator killer (da SILVA, 1996), conferindo qualidade superior ao produto final. As linhagens nativas estão melhores adaptadas às condições climáticas e práticas culturais específicas da região, possuindo propriedades intrínsecas mais adequadas para a elaboração do vinho (SILVA; SILVA, 1987). A produção de H<sub>2</sub>S por leveduras é um problema frequente durante a elaboração de vinhos, pois produz o odor característico de ovos podres. Portanto, é interessante selecionar linhagens de *Sacch. cerevisiae* que não liberem este gás durante a fermentação evitando a formação de aromas indesejáveis (WLODARCZYK, 2013). O mais ponderoso é saber se a levedura que é selecionada para a vinificação é neutra, ou seja, não tem proteína killer funcional e é resistente ou imune ao fator killer (SILVA, 1996). O objetivo geral deste trabalho é avaliar o perfil enológico de cinquenta linhagens de levedura isoladas de bagas de uvas do cultivar Goethe Primo de Urussanga-SC.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental foi executado no laboratório de microbiologia aplicada sob a supervisão do Dr. Gildo Almeida da Silva no Centro Nacional de Pesquisa Uva e Vinho (CNPUV). Todos os microrganismos nativos isolados e testados neste trabalho, assim como todo pessoal envolvido na execução e orientação estão devidamente cadastrados no SisGen (SisGENA93F430- 2000-16/11/2015; SisGEN-A603BA9-17/11/2015). As abreviações dos gêneros, quando usadas, seguiram as Coleções Internacionais ATCC, CBS, LKB e NRRL e por Kreger-van-Rij (KREGER-VAN RIJ, 1984). A uva Goethe utilizada no trabalho é cultivada em vinhedos da Epagri em Urussanga-SC, conhecida como “Vale da Uva Goethe”. As linhagens isoladas receberam nomenclatura com indicação da variedade e do local da colheita e ano de isolamento. Foram então denominadas de GPEpU17. Para o isolamento das leveduras, as bagas da uva foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e cuidadosamente esmagadas com as mãos, em capela de fluxo laminar, com a finalidade de obter o mosto da uva. Com o auxílio de uma pipeta estéril, foi retirada uma alíquota de 1,0 mL do mosto e transferida para tubos de ensaio, contendo 9 mL de água (osmose reversa) estéril e, a partir desta diluição de  $10^{-1}$ , foram realizadas diluições seriadas  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$ . Foi retirado 0,1 mL de cada diluição e transferido para o centro de uma placa de Petri, contendo meio mosto MA. A capacidade fermentativa das leveduras da série GPEpU17 utilizada neste trabalho foi comparada com as linhagens padrão da Coleção de Leveduras do Laboratório de Microbiologia da Embrapa Uva e Vinho, linhagem neutra *Sacch. cerevisiae* 1VVT97(SILVA, 2005) e K1. Para a realização dos experimentos foram utilizados três meios de cultivo: 1) Meio Mosto Ágar (MA), descrito por Silva (1996) e 2) Meio Mosto Sulfito (MS) definido por Silva & Silva (1987) e 3) Meio Mosto Ágar 80:20 (MA80:20) segundo Silva et al. (2011). Para o preparo do meio MA80:20 faz-se necessário utilizar o meio ELNC, segundo Silva & Almeida (2006). As suspensões de células foram obtidas, pela diluição de uma alçada da levedura recém-crescida no meio Mosto Ágar em tubos de ensaio contendo água destilada estéril em uma concentração aproximada de  $10^7$  células. Para a realização do teste de capacidade fermentativa e produção de  $H_2S$ , as amostras foram colocadas em tubo de ensaio com tampa rosqueada contendo 9 mL de mosto sulfito em triplicada. As fitas impregnadas com acetato de chumbo 3% foram postas na parte superior do tubo, permanecendo dentro do tubo, e acima do meio Mosto Sulfito (SILVA e SILVA, 1984). Os tubos foram transferidos para estufa e incubados a  $24^{\circ}C$ . Como o chumbo reage com o enxofre para formar sulfito de chumbo, esta reação faz com que a cor do papel de filtro passe do branco para o marrom escuro/preto. Para o teste de velocidade de fermentação com o objetivo de avaliar a capacidade fermentativa de cada linhagem. A avaliação foi efetuada por gravimetria (GIUDICI & ZAMBONELLI, 1992; LONGO et al., 1992; da SILVA et al., 2011b) em tubos de ensaio (20 mL) com tampa rosqueável. A fermentação foi conduzida a  $24^{\circ}C$ , com ausência de agitação em estufa. Os valores obtidos na pesagem remetem ao  $CO_2$  desprendido em intervalos de seis e 18 horas, no período de 96 horas (SILVA e SILVA, 1984) e os resultados das pesagens foram comparados à velocidade de desprendimento de  $CO_2$  das linhagens tomadas como padrão 1VVT97 e K1 que apresentam potencial fermentativo adequado. A determinação do fator killer foi realizada em duplicada em placas de Petri, contendo meio MA 80:20 (SILVA et al., 2011) e o fator killer positivo é indicado pela formação de um halo de inibição ao redor das leveduras sensíveis (SILVA, 1996). A sensibilidade das linhagens selecionadas contra as linhagens killer foi avaliada em placas de Petri contendo o mesmo meio MA 80:20. Inicialmente as placas foram semeadas pipetando 0,1 mL de uma suspensão de concentração de  $10^7$  células/mL das linhagens de cada uma das séries GPEpU17 com o auxílio de uma alça de Drigalski. Logo após, duplos pontos de inóculo das linhagens conhecidas por apresentar capacidade killer foram aplicados sobre as linhagens das séries previamente espalhadas. As placas foram mantidas em estufa a  $24^{\circ}C$  por

três dias, então foi observado os resultados de sensibilidade. A identificação das linhagens foi por Maldi-TOF/MS e por Reação em cadeia da polimerase (PCR) em que a extração do DNA das linhagens foi realizada a partir do congelamento e descongelamento das suspensões conforme descrito por Silva et al. (2012). Foi amplificada, por PCR, a região ITS do rDNA ITS1-5.8S-ITS2, com os primers (iniciadores) ITS1 e ITS4 (AGUSTINI et al., 2014) e caso não identificadas as linhagens será necessário sequenciamento da D1/D2.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES.

Os resultados deste trabalho mostraram que nenhuma levedura apresentou alta velocidade fermentativa quando comparadas as leveduras padrão de fermentação do laboratório de microbiologia aplicada, aliada a fermentação foram formados diferentes níveis de H<sub>2</sub>S em diferentes linhagens da série (36%), divididos em 4 leveduras alta produção, 3 linhagens de média e 11 leveduras de baixa formação de H<sub>2</sub>S. Somente 12% apresentaram atividade killer a leveduras sensíveis tomadas como padrão de laboratório, 50% das linhagens apresentarão sensibilidade ao fator killer de leveduras consideradas como padrão de laboratório, 28% das leveduras são sensíveis a linhagens killer da próprias série (GPEpU17) e 38% ficaram caracterizadas neutras. Dentre as 50 leveduras isoladas na série (GPEpU17), 2 foram identificadas por PCR/RFLP, a 24GPEpU17(neutra e com média produção de H<sub>2</sub>S) e a 42GPEpU17 (neutra e com alta produção de H<sub>2</sub>S). Sugerindo-se a primeira linhagem ser do gênero e espécie *Issatchenkia terricola* e respectivamente a segunda ser do gênero e espécie *Saccharomyces vini*. As demais linhagens foram identificadas por MALDI-TOF/MS e ficaram divididas entre os gêneros e espécies *Hanseniaspora opuntiae*, *Candida diversa*, *Zigoascus meyeriae* e *Issatchenkia terricola*. Estudos relatam diferentes taxas de fermentação por leveduras a partir de vinhedos e superfície de uvas maduras. Bruneli et al (2017) caracterizando leveduras isoladas de uvas ‘Goethe Tradicional’ da Região dos Vales da Uva Goethe, Urussanga-SC, Nenhuma linhagem apresentou alta velocidade fermentativa, sete foram classificadas como altas produtoras de H<sub>2</sub>S, cinco apresentaram pouca produção de H<sub>2</sub>S, 38 não apresentaram produção de H<sub>2</sub>S. Nove linhagens apresentaram fator Killer, quatro apresentaram sensibilidade ao fator killer e apenas uma linhagem apresentou sensibilidade ao fator killer a quatro linhagens da própria série

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As leveduras presentes nas bagas de uva nem sempre apresentam aptidão enológica adequada à elaboração de vinhos

**AGRADECIMENTOS:** Apoio Financeiro: Embrapa-SEG, Macroprograma 2, Projeto 02.13.03.00

## REFERÊNCIAS

- AGUSTINI, B. C., *Evaluation of maldi-tof mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database*. Appl Microbiol Biotechnol, v. 98, n.12, p. 5645–5654, 2014.
- BRUNELLI, R. E. *Caracterização da diversidade de linhagens de levedura (GTRUf17) isoladas de uvas ‘Goethe Tradicional’ da Região dos Vales da Uva Goethe, Urussanga-SC*. XV Encontro de Iniciação Científica e XI Encontro de Pós-graduandos da Embrapa Uva e Vinho. Bento Gonçalves,RS. nos dias 11 a13 de Julho 2017.
- CANOSSA, S. et al. *Caracterização das leveduras isoladas de uvas das cultivares Malvasia Bianca e Moscato Alexandria da região de Farroupilha-RS*. XII Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Uva e Vinho - VIII Encontro de Pós-graduandos da Embrapa Uva e Vinho. Bento Gonçalves, 24 a 25 de Julho, 2014.
- GIUDICI, P.; ZAMBONELLI, C. *Biometric and genetic study on acetic acid production for breeding of wine yeast*. Am. J. Enol. Vitic. , v.43, n.4., p.370–374. 1992.
- KREGER-VAN RIJ, N. J. W. *The yeasts: a taxonomic study*. 3.ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1984.
- LIMA, T. R. et al. *Caracterização da diversidade de leveduras isoladas de uvas Malbec de Campo Belo do Sul, SC*. XV Encontro de Iniciação Científica e XI Encontro de Pósgraduandos da Embrapa Uva e Vinho. Bento Gonçalves, 11 a 13 de Julho, 2017.

- LONGO, E. et al. Influence of the curing killer phenotype in *Saccharomyces cerevisiae* wine in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains on the fermentative behaviour. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* v.8: p.147-150, 1992.
- LOPES, C. A. et al. *Patagonian wines: implantation of an indigenous strain of Saccharomyces cerevisiae in fermentations conducted in traditional and modern cellars*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 34, p. 139-149. 2007.
- SILVA, G.A., et al.; *Composição do meio e sua relação com a expressão killer*. XII Congresso brasileiro de viticultura e enologia, 2008b, Bento Gonçalves. Anais. Bento Gonçalves: Embrapa, 2008b. p. 158.
- SILVA, M. A. A. A. e da SILVA, G. A. *Leveduras nacionais selecionadas para a elaboração de vinho*. Technical report, Embrapa, CNPUV. p. 5-9, Circular Técnica Bento Gonçalves, 1987.
- SILVA, G. A. *The occurrence of killer, sensitive and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italic grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 46, p. 112-121, 1996.
- SILVA, G.A *Influência da concentração de levedura sobre o vinho tinto cabernet sauvignon*. In: *X Congresso brasileiro de viticultura e enologia - XI Congresso brasileiro de viticultura e enologia - II Seminário franco-brasileiro de viticultura e enologia*, 1, 2005, Bento Gonçalves. Bento Gonçalves: Editado por Celito Crivellaro Guerra e Sandra de Souza Sebben, 2005a. v. 1, p. 345-345.
- SILVA & ALMEIDA, E. A. *Production of yellow-green fluorescent pigment by Pseudomonas fluorescens*. *Brazilian Archives Biology and Technology*, 49, p. 165-177, 2006.
- SILVA, G.A. et al. *Production of functional killer protein in batch cultures upon a shift from aerobic to anaerobic conditions*. *Brazilian Archives of Biology and Biotechnology*, v. 54, p. 601-612, 2011
- SILVA, G. A. e da SILVA, M. A. A. A. *Determinação qualitativa da produção de sulfeto de hidrogênio por leveduras*. *Tecnologias geradas pelo sistema Embrapa*. Relatório técnico. Embrapa-DDT, Brasília, 1984.
- WLODARCZYK, S. R. et al. *Avaliação de Leveduras Isoladas na Região de Pinto Bandeira, Bento Gonçalves (RS) com relação à Produção de H<sub>2</sub>S e Velocidade de Fermentação*. *BBRBiochemistry and Biotechnology Reports*, v. 1, n. 2, p. 24-27, 2013.