



Microbiologia Enológica

Leveduras dos géneros *Dekkera/Brettanomyces*

Mestrado de Viticultura e Enologia



Leveduras de contaminação

Tipo de alteração:

- Aroma (vinificação, armazenagem, garrafa)
- Turvação/sedimentos (garrafa)
- Véu (armazenagem)
- Refermentação (vinhos adamados)

Dekkera/Brettanomyces: Alteração do aroma pela produção de fenóis voláteis

Evolução do estudo e conhecimento de *Dekkera/Brettanomyces*

- 1904 - Isolamento de cervejas (Claussen)
- 1940 - Isolamento de vinhos (Custers)
- 1986 - Produção de fenóis voláteis (Heresztyn)
- 1995 - Único agente de alteração em vinhos pela produção de fenóis voláteis (Chatonnet)
- Outras leveduras ou bactérias lácticas não produzem teores suficientes para afectar negativamente o aroma dos vinhos

O problema de *Dekkera* em vinhos

- Actividade como levedura de alteração de vinhos
- Desvalorização parcial ou total dos vinhos
- Produtos do metabolismo de alteração em vinhos:

Esterases ⇨ perda de aromas

Tetrahidropiridinas ⇨ cheiro a rato

Ácido acético ⇨ sabor a vinagre

Fenóis voláteis

- Descritores aromáticos associados
“suor de cavalo”, “estrebaria”, “couro”,
“animal”, “medicinal”, “remédio”, “fenólico”

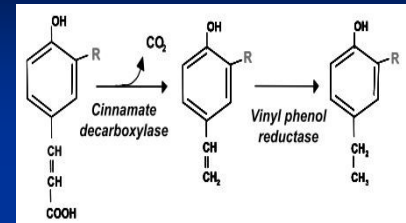


Metabolización de los ácidos hidroxicinâmicos

Ésteres cinâmicos del ácido tartárico

Ácido tartárico

- . Hongos en uvas podres
- . Actividades de enzimas pectolíticas
- . Bacterias lácticas en la maloláctica



Hydroxycinnamic acid	Hydroxystyrenes	Ethyl derivatives
p-coumaric acid	4-vinylphenol	4-ethylphenol
ferulic acid	4-vinylguaiaacol	4-ethylguaiaacol
caffeic acid	4-vinylcatechol	4-ethylcatechol

Muchas especies de levaduras

Dekkera bruxellensis
Dekkera anomala
Pichia guilliermondi

Caracterização de *Dekkera/Brettanomyces*

■ Nomenclatura:

Enólogos e Tecnologistas: *Brettanomyces* ou “Brett”

Taxonomistas: **Género *Brettanomyces***

forma imperfeita (anamorfo; forma assexuada de *Dekkera*)

Género *Dekkera*

forma perfeita (teleomorfo)

Actual classificação taxonómica (Kurtzman and Fell, 1998):

Género *Dekkera*

D. bruxellensis
D. anomala

Género *Brettanomyces*

B. bruxellensis *B. naardenensis*
B. anomala *B. nanus*
B. custersianus

Caracterização de *Dekkera/Brettanomyces*

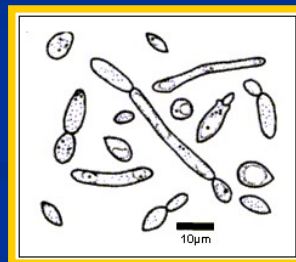
■ Características gerais:

- Actividade fermentativa fraca
- Crescimento muito lento
- Nem sempre formam película à superfície
- Produção de elevadas quantidades de compostos secundários indesejáveis
- Moderada tolerância ao álcool (crescimento em meio sintético até 15,5% (v/v) etanol, após adaptação)
- Crescimento em vinhos com baixas concentrações de açúcares (< 2 g/l glucose)
- Resistência aos conservantes (ácido benzóico, sórbico) e sensibilidade ao anidrido sulfuroso

Caracterização de *Dekkera/Brettanomyces*

■ Morfologia das células:

- Mais pequenas que *Saccharomyces*
- Bastante heterogêneas
- Gemulação polar
- Presença de cicatrizes de gemulação
- Formas: ogival, elíptica, semelhantes a um limão arredondado, alongada e ramificada
- Possível formação de pseudo-hifas



Morfologia das células

Uma simples observação microscópica pode ser suficiente para detectar o problema !!!



■ *Dekkera sp.*

- ✓ Esféricas
- ✓ Elipsoides
- ✓ Ovais
- ✓ Cilíndricas a alongadas
- ✓ Cicatrizes de gemulação
- ✓ “Gémula de lado”
- ✓ Formas alongadas



■ *Zygosaccharomyces bailii*

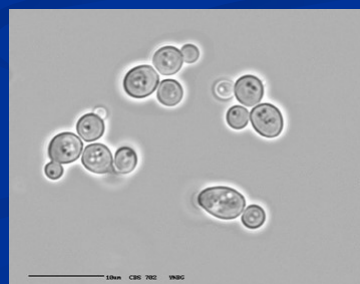


Células esféricas a elipsoides

A formação de **tubos de conjugação** é típica desta espécie

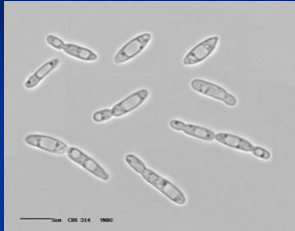
■ *Zygosaccharomyces bisporus*

Células esféricas a elipsoides



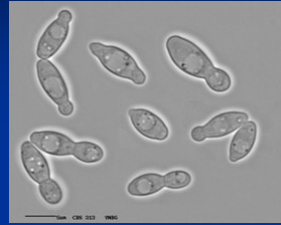
■ Leveduras apiculadas

(Gêneros *Hanseniaspora*/*Kloeckera*)



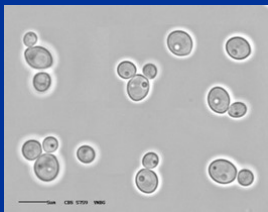
H. uvarum (*K. apiculata*)

Células apiculadas,
esféricas a ovais,
em forma de limão



H. Osmophila (*K. corticii*)

■ *Pichia*



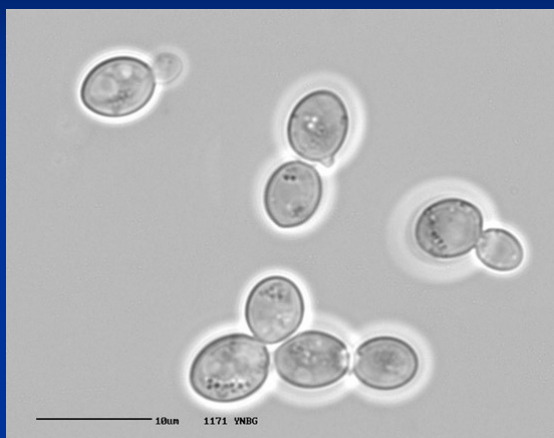
P. anomala (*Candida pelliculosa*)

Células esféricas,
elipsoides ou
alongadas



P. membranifaciens (*C. valida*)

■ *Saccharomyces*



S. cerevisiae

Células tipicamente
globosas, elipsoides
ou cilíndricas,
podendo ser
ligeiramente
alongadas

Caracterização de *Dekkera/Brettanomyces*

■ Distribuição e Ecologia:

- Presença de *Dekkera* nas adegas associada a reduzidos cuidados de higiene

- Locais de maior risco de crescimento de *Dekkera* :

Equipamentos

Tubagens e válvulas

Nicho ecológico mais importante:

Barricas de carvalho



- Podem contaminar os vinhos em todas as fases da sua elaboração

Incidência de fenóis volateis em vinhos tintos

País/Região	Amostras	>426 ppb	>620 ppb	Referência
França/Bordeaux	100	36%	28%	Chatonnnet <i>et al.</i> (1992)
Itália/Piemonte	47	49%	19%	Di Stefano (1985)
Austrália	61	59%	46%	Pollnitz <i>et al.</i> (2000)
Portugal	366	42%	27%	Our work

426 ppb – Limiar de preferência do 4-etilfenol + 4-etilguaiacol (10:1)

620 ppb – Limiar de preferência do 4-etilfenol

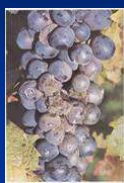
Controlo de *Dekkera/Brettanomyces*

1ª Chave para o sucesso:

Gestão das Fermentações:

- Boa gestão da fermentação alcoólica:
(sulfitação, inoculação, nutrição das leveduras)
- Início rápido da FML:
(para vinhos de risco, inocular bactérias)
- Estabilização eficaz no final da FML:
(eliminação precoce das borras grossas, adição de SO₂ em quantidade suficiente)

Pontos críticos de contaminação e/ou controlo de *Dekkera/Brettanomyces*



Utilização de uvas podres



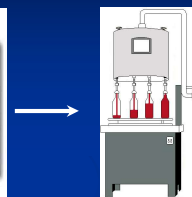
Final da Fermentação maloláctica



Estágio



Lote final antes do engarrafamento



- E ainda:
- ✓ Vinhos provenientes de outros produtores
 - ✓ Raspas do interior de barricas lavadas
 - ✓ Água de lavagem de barricas
 - ✓ Sempre que a prova do vinho sugira um aroma anormal

Ferramentas e armas contra *D. bruxellensis*

- Detecção específica em vinhos
- Depleção de oxigénio em vinhos
- Filtração esterilizante dos vinhos infectados
- Desinfecção das barricas e equipamentos por vaporização sob pressão
- Armazenamento a baixas temperaturas
- **Melhor forma de prevenção:**
 - Controlo microbiológico e da higienização devem ser redobrados
 - Manutenção de níveis adequados de SO₂ livre (30 mg/l)



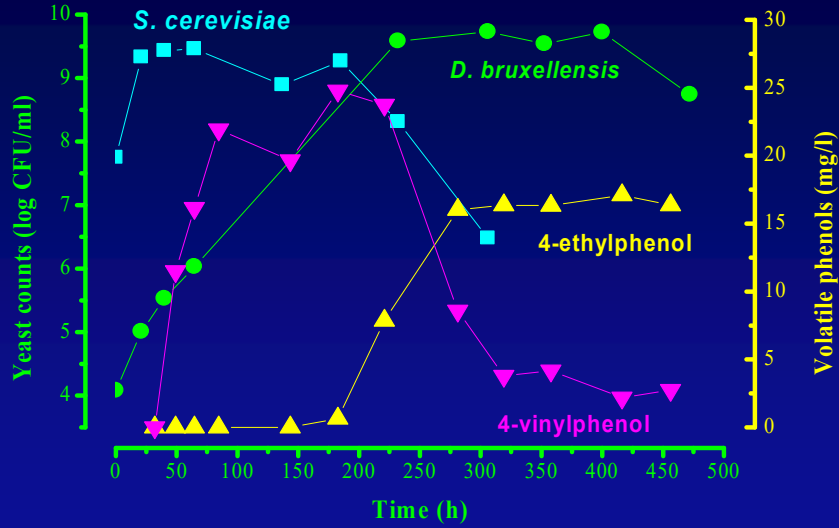
Microbiologia Enológica

Diversidade de comportamento de *Dekkera/Brettanomyces* em vinho



André Barata
Dep. de Botânica e Engenharia Biológica
Centro de Botânica Aplicada à Agricultura
Instituto Superior de Agronomia
Tapada da Ajuda, Lisboa

Mixed culture with *S. cerevisiae*



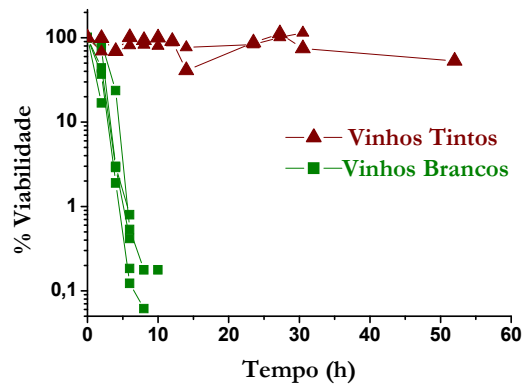
Cells grown in YNB + 10% glucose + 10% fructose

Comportamento de *D. bruxellensis* em vinho

Defeito de *Dekkera* em vinhos?



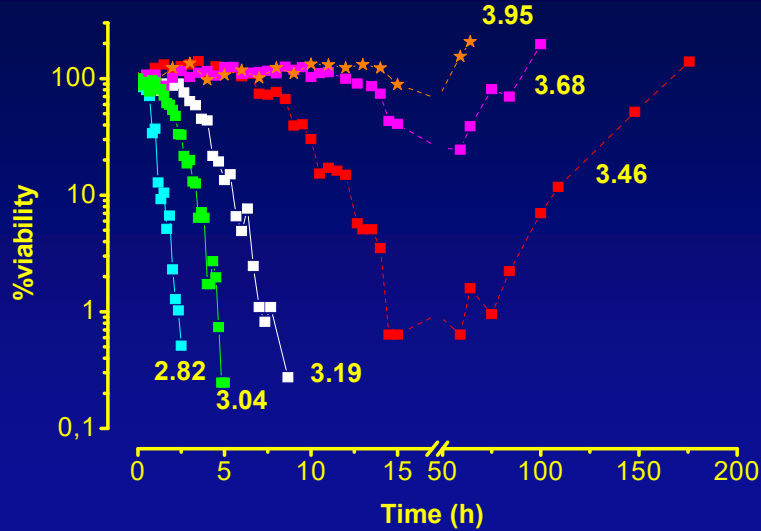
Normalmente associado a Tintos!



Diversidade de comportamento de *Dekkera/Brettanomyces* em vinho



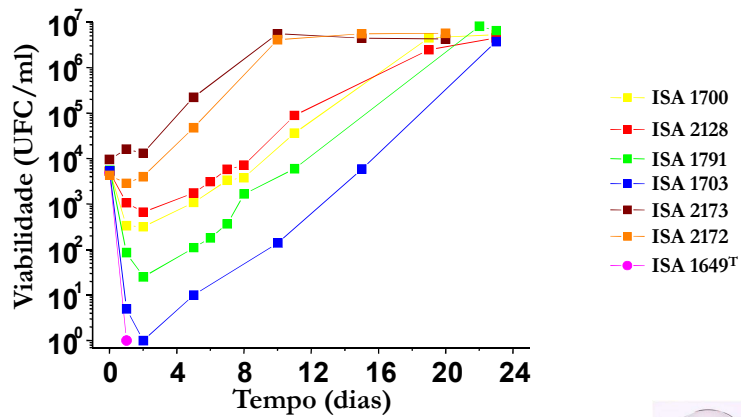
pH effect on *D. bruxellensis* viability in white wines



Initial inoculum 10^3 cells/ml

Comportamento de *D. bruxellensis* em vinho tinto a médio prazo

- Inóculo 10^4 cel/mL de 7 estirpes diferentes de *D. bruxellensis*
- Mesmo vinho Tinto: 12% (v/v) etanol; pH=3.5



Diversidade de comportamento de *Dekkera/Brettanomyces* em vinho

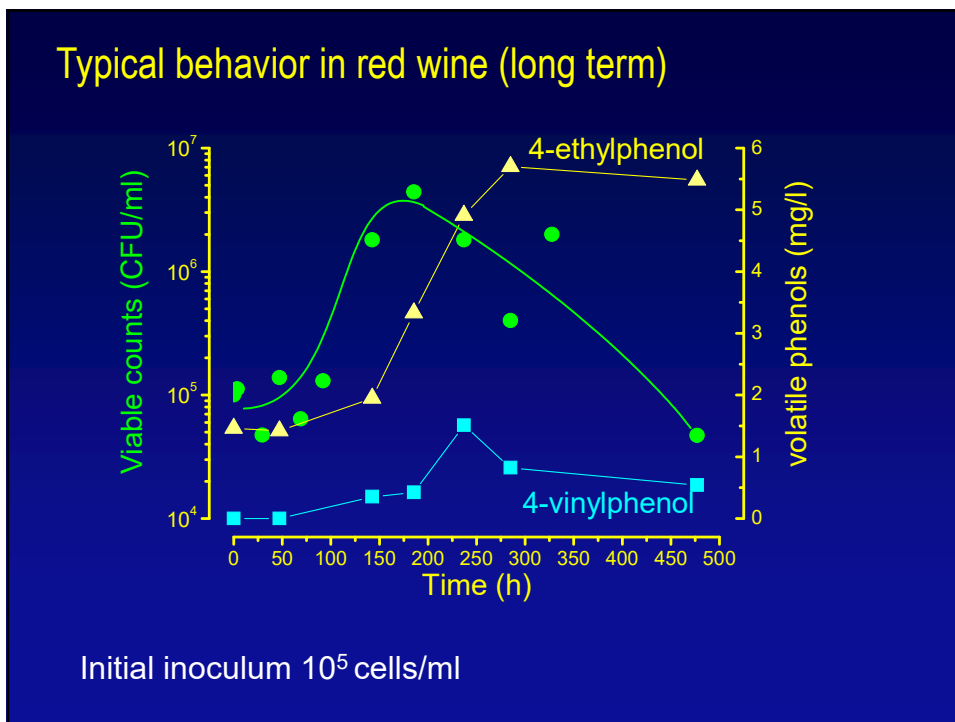
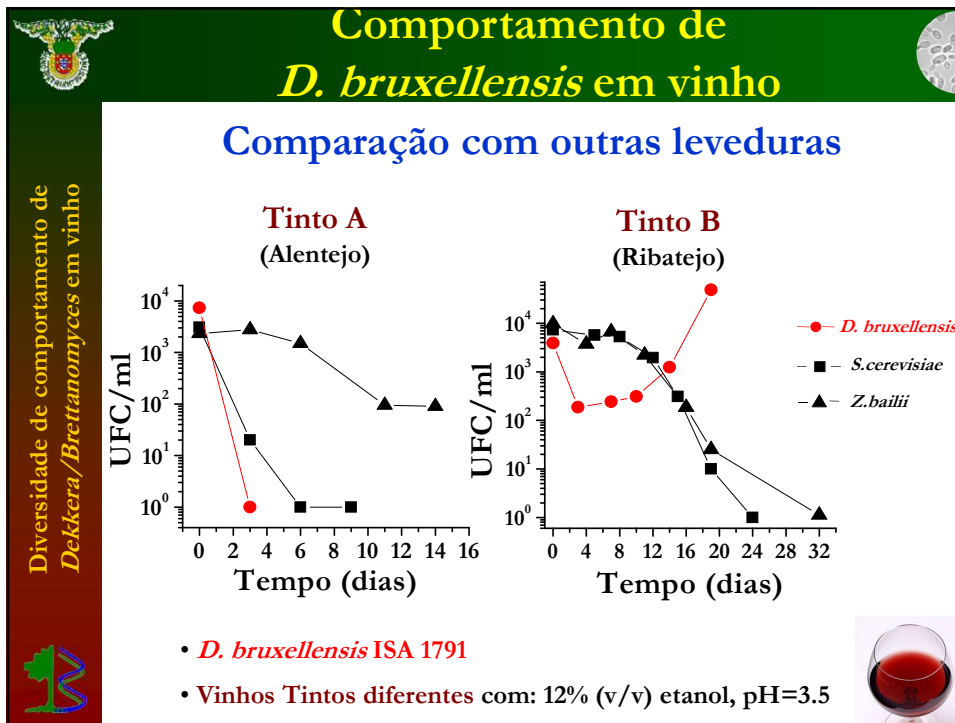


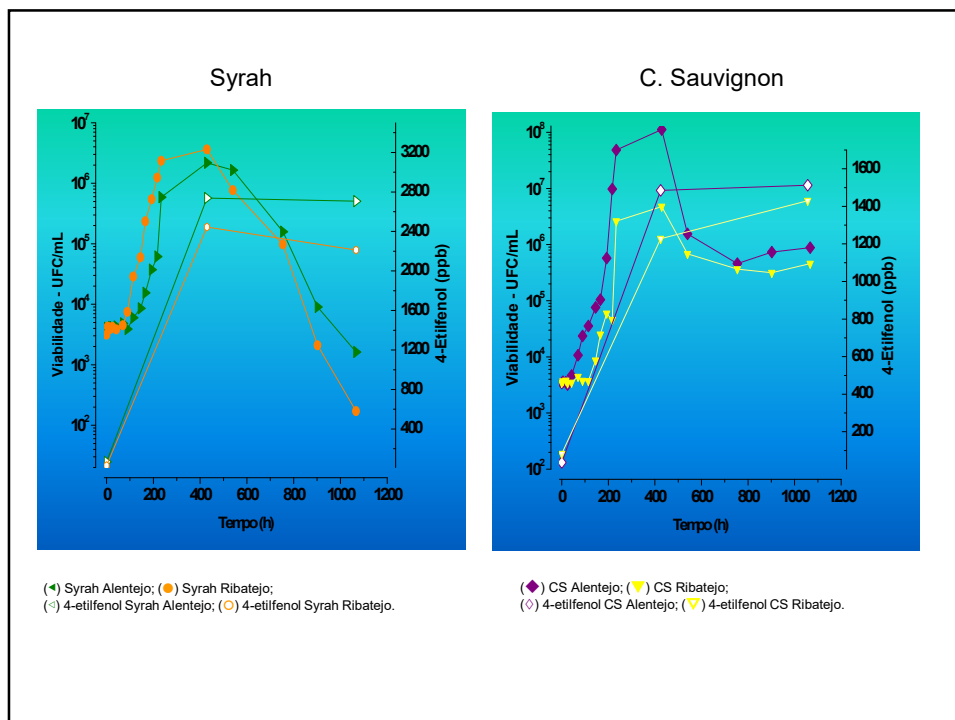
Típico comportamento de *Dekkera*



Diferentes sensibilidades no mesmo vinho!







Principais factores que influenciam a produção de 4-etilfenol e/ou a viabilidade de *Dekkera*

 Etanol

 pH

 Oxigénio

 Temperatura

 Conservantes:

- Sorbato de potássio
- Dimetildicarbonato
- Anidrido sulfuroso



Efeito do Etanol

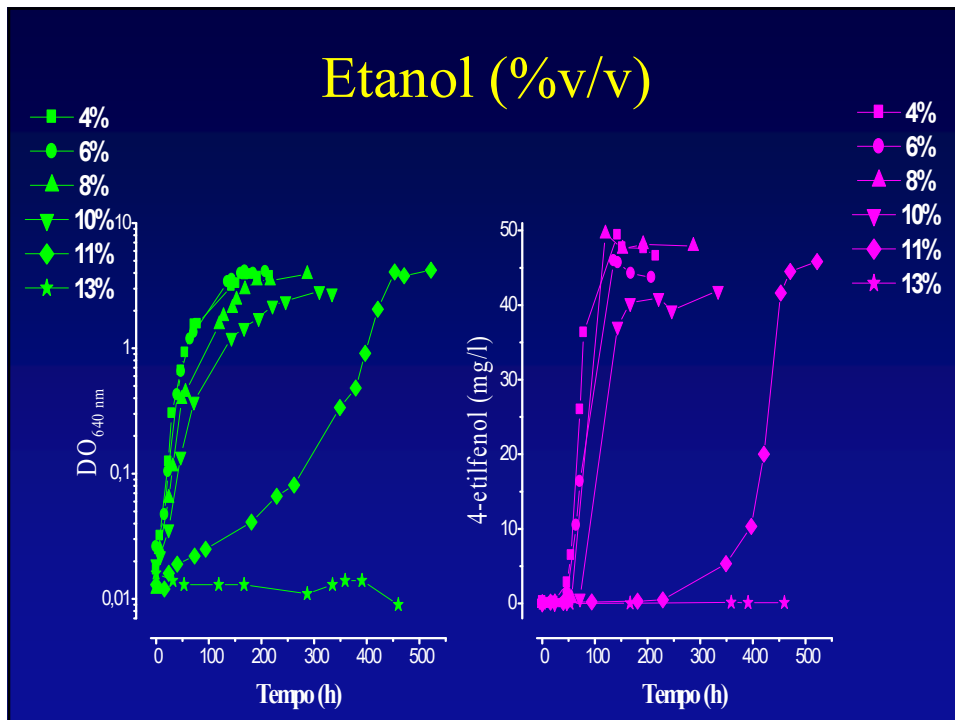
Factos:

- Vinhos com elevado grau alcoólico (> 14.0%) raramente possuem níveis elevados de 4-etilfenol.
- *D. bruxellensis* raramente isolada de vinhos com > 14.0% etanol.

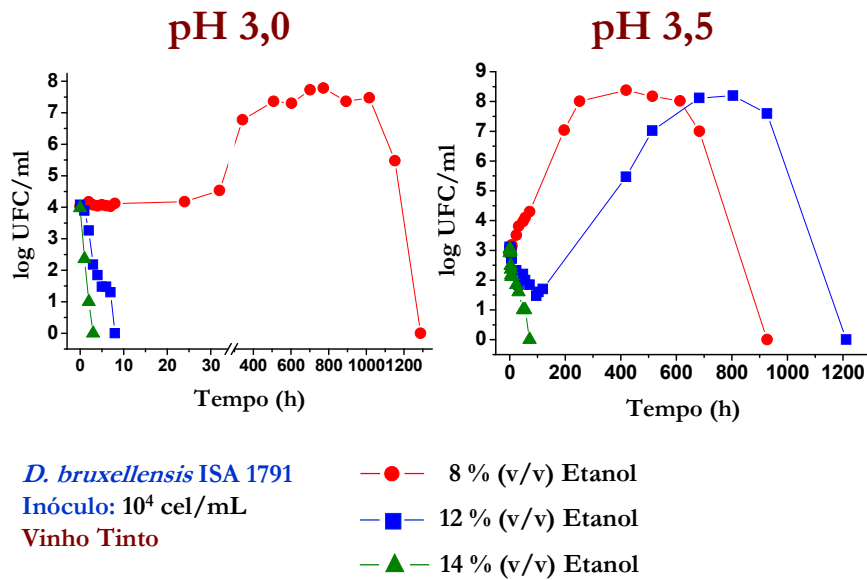
Screening de tolerância ao Etanol

Espécies	MIC (%v/v)	Número de estirpes
<i>S. cerevisiae</i>	17.0	1 (starter)
<i>D. bruxellensis</i>	15.5	2
	15.0	17
	14.5	5
	14.0	3
	10.0	1 (type strain)

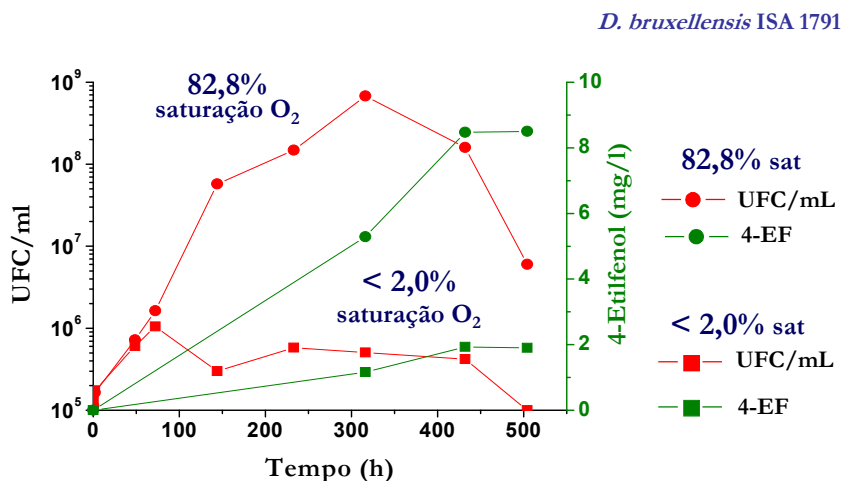
Crescimento: Meio YNB, pH=3.5, 20 g/l glucose



Efeito do Etanol e do pH



Efeito do Oxigénio em vinho tinto

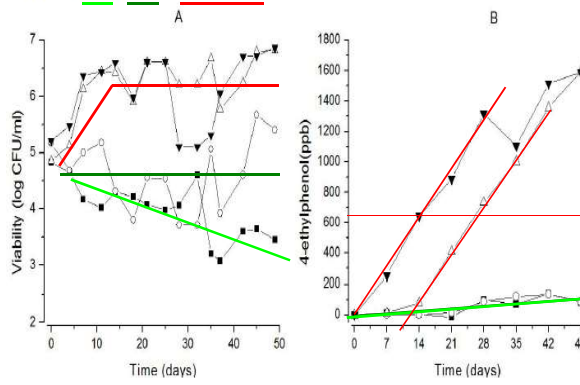


Barricas: difusão de 30 mg/1 oxigénio/ano

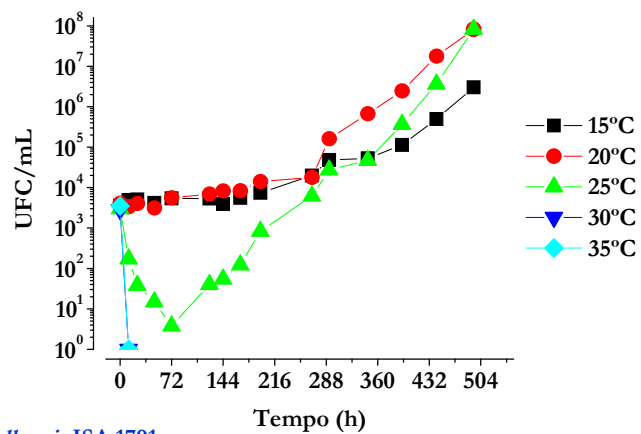
Engarrafamento incorrecto: introdução de 4 mg/1 (~50% saturação)

Viability of cell growth (A) and volatile production of TR 26 (B)
grown in red wine

Symbols: ■ 3°C, ○ 10°C, △ 15°C, ▼ 20°C.



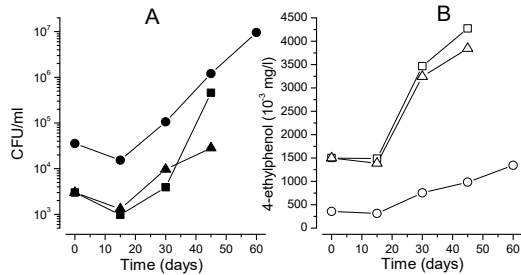
Efeito da Temperatura



- *D. bruxellensis* ISA 1791
- Vinho Tinto 12% (v/v) etanol, pH=3,5

**Growth (A) and 4-ethylphenol production (B)
contaminated by wild populations of *D. bruxellensis***

Wine I
15 °C (■, □)
25 °C (▲, △)
Wine II
15 °C (●, ○)



Sample	Temperature	4-EP production rate (µg/l.day)	Days to produce 620 µg/l 4-EP
Wine I	15°C	93	6.7
Wine I	25°C	82	7.6
Wine II	15°C	22	28.2

Efeito dos Conservantes: SO₂

Screening de tolerância ao Metabissulfito de Potássio

Espécies	MIC (ppm)	Número de estirpes
<i>S. cerevisiae</i>	210	1 (starter)
<i>D. bruxellensis</i>	40	6
	60	6
	70	7
	80	6
	90	3
	100	2

Crescimento: Meio YNB, pH=3.5, 20 g/l glucose

- *D. bruxellensis* apresenta variações consideráveis de resistência ao SO₂.

Controlo microbiológico

- Amostragem
- Estado VBNC
- Meios de cultura selectivos e diferenciais
- Métodos moleculares
- Metodologias de rotina
- Implicações tecnológicas

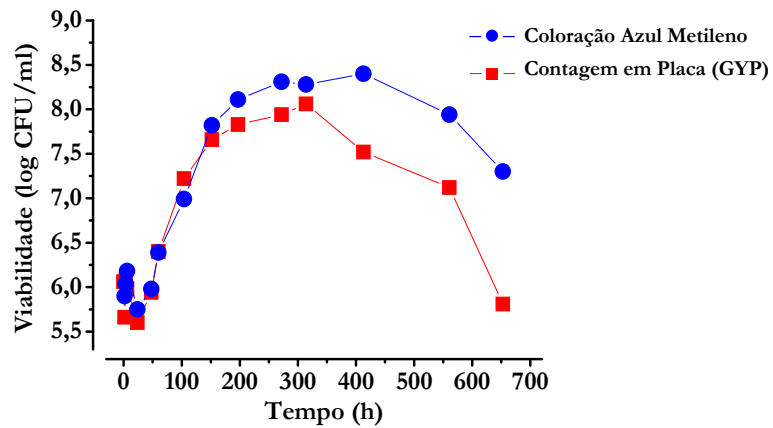
Amostragem para a análise de *Dekkera/ Brettanomyces*

Cuidados específicos na recolha da amostra
(Amostra Representativa):

- **Heterogeneidade na distribuição das células:**
 - Interface vinho /ar: localização especial (O₂)
 - Sulfurador: pode saturar a fase gasosa em sulfuroso
 - Provadeira: potencial fonte de oxigénio
 - Barrica: atestos e efeito das trasfegas (sub-amostras de várias secções)
- **Periodicidade**

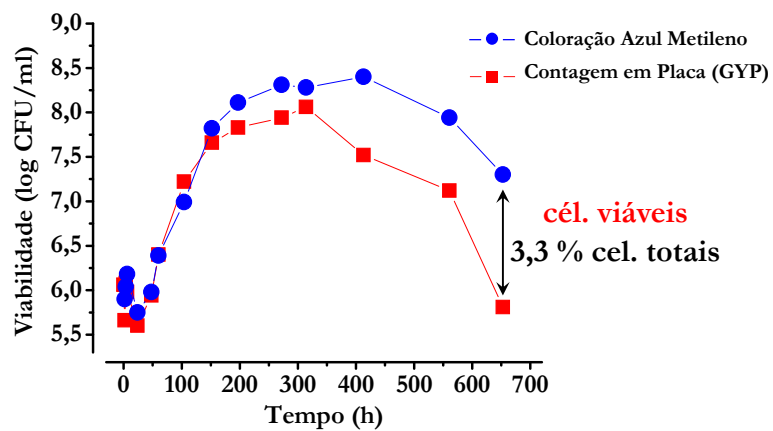
Evidência de um estado “Activo mas não cultivável”

Viabilidade celular (ISA 1791)
12% (v/v) Etanol, pH=3.5

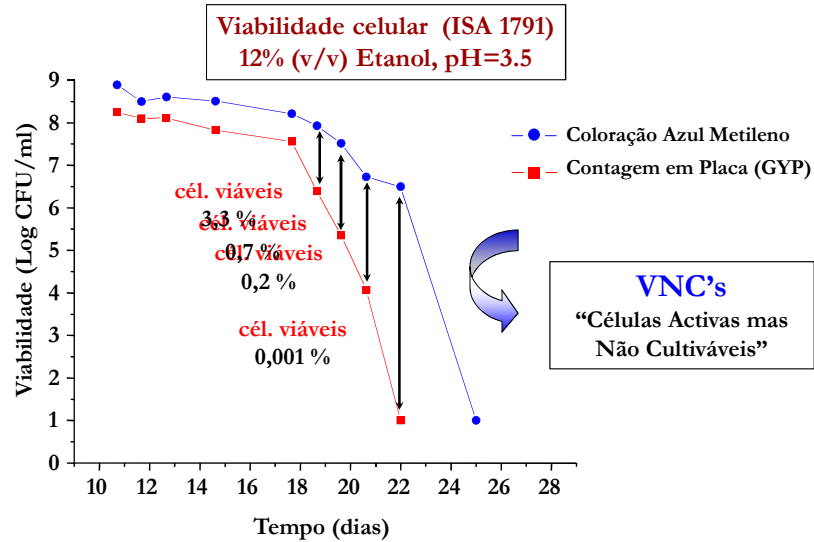


Evidência de um estado “Activo mas não cultivável”

Viabilidade celular (ISA 1791)
12% (v/v) Etanol, pH=3.5



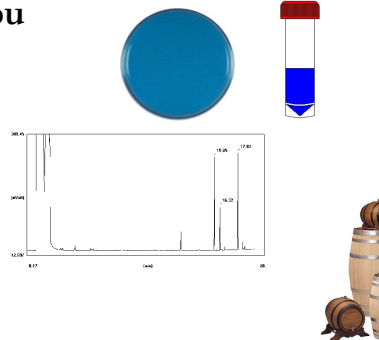
Evidência de um estado “Activo mas não cultivável”



Proposta do indicador EPPY

EPPY (Ethyl-Phenol Producing Yeasts)

- Leveduras EPPY como indicador do perigo de alteração dos vinhos.
- Análise com BA, sólido ou líquido.
- Conjugação com a determinação de fenóis voláteis.



Estratégia de detecção e identificação

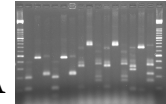
⇒ Meio de cultura

BA líquido/sólido

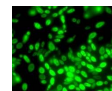


⇒ Identificação da espécie

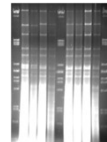
• RFLP da região 5.8S - ITS do rRNA



• FISH com sonda de PNA para *D. bruxellensis*



⇒ Identificação da estirpe
Restrição do mtDNA



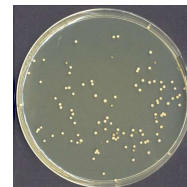
Meio BA parcialmente selectivo e totalmente diferencial

Diferencialidade:

- Meio vira de azulado/verde a amarelado,
- Cheiro fenólico típico,
- Colónias amareladas que escurecem com o tempo

Resultados após:

- 5 a 10 dias (*Dekkera/Brettanomyces*)
- 2 a 5 dias (outras espécies)

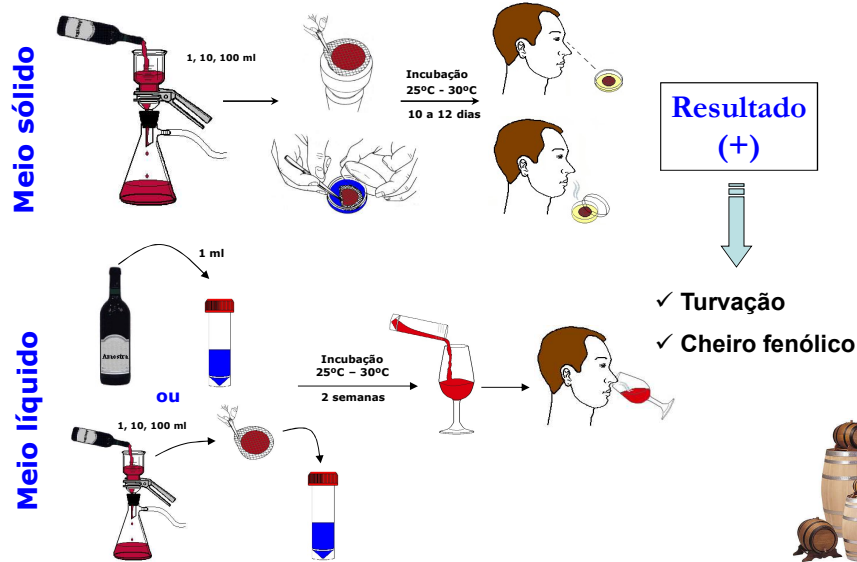


10 dias



Indicadores microbiológicos

Método:



Indicadores microbiológicos

1. Vinhos armazenados

Detecção + em 1 ml ou menos
4-etilfenol > 150 ppb

Tratamento:

Filtração fina e sulfuroso

2. Engarrafamento

Detecção + em 10 ml ou menos

Filtração esterilizante e sulfuroso

Detecção + em 100 ml

Adição de sulfuroso e ausência de oxigénio
 Filtração fina/esterilizante
 Ou enchimento a quente

Considerações finais

- Ausência de elevados níveis de 4-etilfenol em vinhos brancos está relacionada com a ausência de crescimento de *D. bruxellensis* neste tipo de vinhos;
- Evidência para diferentes sensibilidades das estirpes e diferentes susceptibilidades dos vinhos tintos;
- Dióxido de enxofre (SO₂) é o conservante mais eficaz sobre *Dekkera/Brettanomyces*;

Considerações finais

- Adaptação celular ao vinho potencia a resistência ao conservante;
- Temperatura de 15°C não evita o crescimento de *D.bruxellensis* e a produção de 4-etilfenol;
- Estado “Activo mas não cultivável”:
 - Células activas
 - Não detectadas em meio de cultura
 - Falsos negativos!

Três ideias para concluir...

- Os mecanismos de alteração são bem conhecidos
- *Dekkera* existe na adega! Temos de saber viver com ela!
- O melhor meio de combate é prevenir o desenvolvimento da levedura recorrendo ao controlo microbiológico adequado e a cuidados de higienização redobrados.