

Bioproteção específica contra a *Brettanomyces*

Controlar naturalmente a *Brettanomyces* no arranque
da produção de vinho com LEVEL² SALVA™

A. Deroite, M. Bastien, A. Dumont, A. Silvano, J.M. Heras e A. Ortiz-Julien

RESUMO

LEVEL² SALVA™ é uma nova levedura não-*Saccharomyces* da espécie *Suhomyces pyralidae* usada como uma bioproteção específica contra a *Brettanomyces bruxellensis* durante as etapas pré-fermentativas da produção de vinho. LEVEL² SALVA™ produz o **Fator de Inibição *Brettanomyces* específico** Spkt1, que interrompe a parede celular da *Brettanomyces*. O nosso estudo demonstra a sua eficácia na redução de populações de *Brettanomyces* e na produção de fenóis voláteis. Pode ser usada em vários estágios de pré-fermentação, incluindo em uvas colhidas até o enchimento da cuba. Além disso, LEVEL² SALVA™ permite uma redução da utilização de SO₂ sem comprometer a estabilidade e a qualidade do vinho, oferecendo uma alternativa natural para gerir a contaminação por *Brettanomyces*.

INTRODUÇÃO

A *Brettanomyces bruxellensis* é um microrganismo de deterioração bem conhecido no vinho, uma vez que o seu desenvolvimento leva à produção de aromas indesejáveis. Os fenóis voláteis produzidos durante a contaminação por *Brettanomyces* estão associados a defeitos no vinho, como mostrado na Tabela 1. Mesmo em baixas concentrações, abaixo do seu limiar de percepção, a presença desses compostos pode diminuir a intensidade aromática dos vinhos e esconder a sua tipicidade.

	Defeito	Concentração/percepção no vinho
4-etilfenol	Celeiro, estábulo	500 µg/L
4-etilguaiacol	cravo-da-índia	100 µg/L
4-vinilfenol	penso rápido	1500 µg/L
4-vinilguaiacol	penso rápido	400 µg/L

Tabela 1. Descrições e limiares de fenóis voláteis (Descripteurs sensoriels et références chimiques - IFV Occitanie)

A *Brettanomyces bruxellensis* pode ser encontrada em diferentes etapas do processo de vinificação. Também pode estar presente em vinhas, mesmo em parcelas específicas dentro de uma vinha. Estudos anteriores estabeleceram claramente a presença de *Brettanomyces bruxellensis* em várias vinhas e em diferentes fases do desenvolvimento da uva após o pintor (Renouf et al., 2007).

1. Controlo clássico contra a *Brettanomyces*

A ferramenta mais comum para evitar contaminações por *Brettanomyces bruxellensis* é a adição de SO₂. No entanto, de acordo com Avramova et al (2018), os fenómenos de adaptação levaram a que a subpopulação de *Brettanomyces bruxellensis* ficasse resistente ao SO₂. Com a tendência de diminuir inputs, incluindo sulfitos, é importante encontrar soluções alternativas para prevenir e inibir o desenvolvimento de *B. bruxellensis* durante a produção e o armazenamento do vinho, além de considerar esta potencial resistência ao SO₂.

2. O interesse de controlar a *Brettanomyces* nas etapas pré-fermentativas

Como a *Brettanomyces* também é encontrada antes do início da fermentação, é necessário ter uma abordagem preventiva para inibi-la e controlá-la usando uma bioproteção. Estas leveduras encontram-se nas uvas, mesmo antes do processo de vinificação, conforme demonstrado por Renouf e Lonvaud-Funel (2007), que o detectaram em amostras colhidas em 4 vinhedos da área de Bordéus em diferentes fases de desenvolvimento da uva, entre o pintor e a colheita. Oro et al (2019) demonstraram a estreita relação entre estirpes de *Brettanomyces bruxellensis* da vinha e da adega com uma análise molecular (região 26S-D1/D2 da sequenciação de ADNr) de 62 amostras de uvas, ambientes vinícolas e mostos

fermentados. Nessa investigação verificou-se que os isolados da vinha e da adega representavam biótipos dominantes e comuns, o que indicava que a vinha é uma fonte de contaminação de *B. bruxellensis* no ambiente vinícola. Mais recentemente, Pigao et al (2021) também isolaram a *Brettanomyces bruxellensis* em 12 dos 149 cachos de uva (amostragem de 2 anos) numa vinha em Oregon.

Atualmente, existem soluções de bioproteção com leveduras não-*Saccharomyces* nas etapas pré-fermentativas, no entanto, não são realmente eficazes contra a *Brettanomyces*.

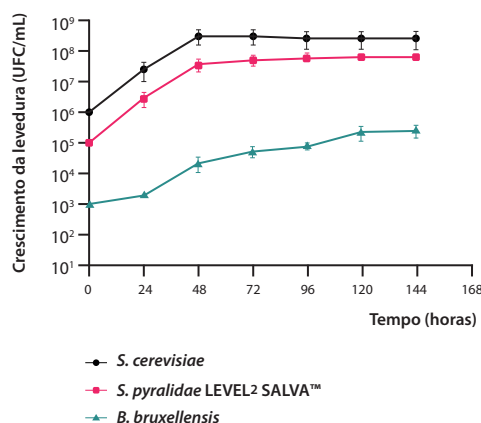
3. Uma nova seleção não-*Saccharomyces*: LEVEL² SALVA™

A *Suhyomyces pyralidae* (anteriormente *Candida pyralidae*) IWB T Y1140 foi isolada num mosto de um Cabernet Sauvignon Sul-Africano (Mehlomakulu et al., 2014) pelo Instituto Sul-Africano de Investigação de Uva e Vinho (Universidade de Stellenbosch). Demonstrou-se que a *Suhyomyces pyralidae* controla e inibe as estirpes *B. bruxellensis* encontradas no ambiente vitivinícola. Atualmente esta estirpe está disponível para os produtores de vinho com o nome LEVEL² SALVA™.

Esta atividade inibidora específica é explicada pela produção de um *Fator de Inibição da Brettanomyces*, denominado Spkt1. Foi demonstrado que as suas condições ótimas de atividade são compatíveis com as condições de vinificação, principalmente em termos de pH e gama de temperatura. A sensibilidade desta estirpe ao etanol faz com que seja a etapa pré-fermentativa o momento de eleição para a sua aplicação (Mehlomakulu et al., 2014).

Conforme apresentado na Figura 1, a levedura LEVEL² SALVA™ inibe a *Brettanomyces bruxellensis* sem impacto sobre o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*. Esta experiência além de confirmar a eficácia de LEVEL² SALVA™ nas etapas de pré-fermentação em condições laboratoriais, também demonstra que a utilização exclusiva da levedura *Saccharomyces*, por vezes, não é suficiente para controlar o desenvolvimento de *Brettanomyces*.

1.A Monocultura



1.B Co-cultura

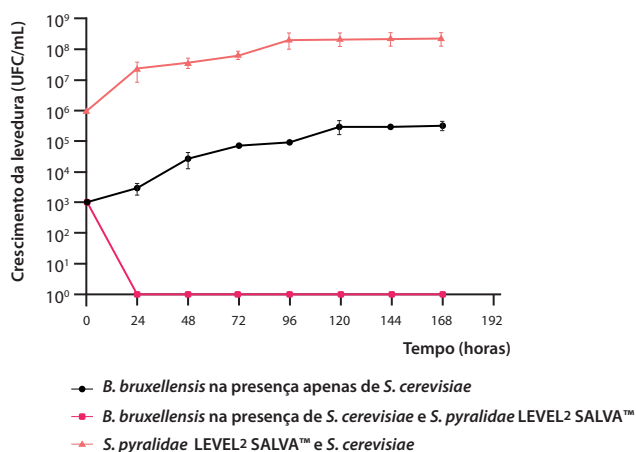


Figura 1: Viabilidade durante a fermentação do mosto de uvas tintas (pH 3,5) a 20°C. 1.A Evolução da população em monocultura de *Brettanomyces bruxellensis*, LEVEL² SALVA™ e *Saccharomyces cerevisiae*. 1.B Evolução da população em co-cultura.

3.1 Caracterização LEVEL² SALVA™

LEVEL² SALVA™ foi caracterizada pelo seu metabolismo de carbono, o seu consumo de NFA e a sua capacidade fermentativa. Com uma necessidade muito baixa de azoto e uma das menores capacidades fermentativas de todas as nossas estirpes não-*Saccharomyces*, combinada com uma boa capacidade de implantação e crescimento, esta levedura é uma excelente candidata para a bioproteção do mosto de uva.

3.2 Mecanismo do Fator de Inibição Spkt1 da *Brettanomyces*

O Fator de Inibição Spkt1 da *Brettanomyces* produzido por LEVEL2 SALVA™ é provavelmente uma enzima que interrompe especificamente a parede celular da *Brettanomyces bruxellensis*. Esta hipótese foi confirmada por uma experiência (Figura 2), inoculando LEVEL2 SALVA™ e uma levedura *Saccharomyces cerevisiae* num meio sem fonte de carbono, mas contendo laminarina. Esta molécula de laminarina foi usada para imitar a parede celular da *Brettanomyces*. A *Saccharomyces cerevisiae*, sem fonte de carbono, não pode crescer. Com o seu fator inibidor da *Brettanomyces*, LEVEL2 SALVA™ foi capaz de hidrolisar a laminarina para usar uma fonte de carbono e crescer neste meio, demonstrando-se que este Fator de Inibição da *Brettanomyces* é produzido exclusivamente por LEVEL2 SALVA™.

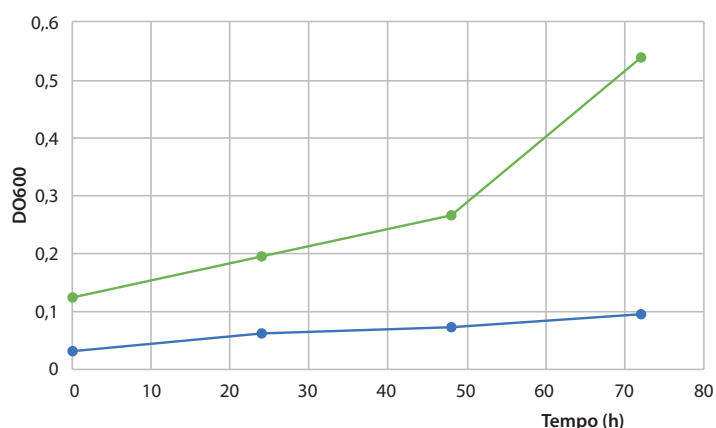


Figura 2 : Crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* A (azul) e LEVEL2 SALVA™ (verde) avaliado através da DO600 num meio mínimo com laminarina.

Mehlomakulu et al., 2017 realizaram uma análise microscópica para validar o impacto do Fator de Inibição Spkt1 da *Brettanomyces* produzido por LEVEL2 SALVA™ na parede celular da *Brettanomyces bruxellensis* (Figura 3). Após 24h de tratamento, as estirpes de *Brettanomyces* apresentaram estrias, mostrando a degradação da membrana, enquanto as células não tratadas estavam lisas, apresentando uma membrana intacta.

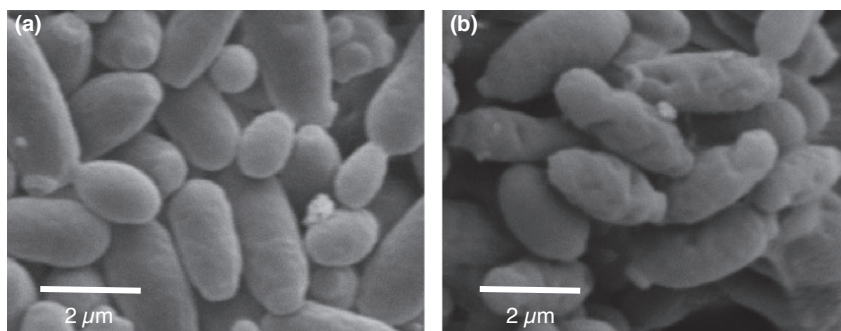


Figura 3. Microscopia de varrimento de *Brettanomyces bruxellensis* (a) Controle; (b) 24h após a exposição ao Fator de Inibição da levedura *Brettanomyces* produzido por LEVEL2 SALVA™ (Mehlomakulu et al. 2017).
Imagens utilizadas com a autorização da Oxford Press.

4. Eficácia da bioproteção de LEVEL2 SALVA™ contra a *Brettanomyces*: validação em mosto de uva à escala laboratorial

LEVEL2 SALVA™ foi totalmente caracterizada tendo em conta vários parâmetros (taxa de inoculação, tolerância ao etanol, tolerância SO₂, etc.) no nosso laboratório de Investigação em Blagnac, França, para determinar as condições ideais da utilização e produção do seu Fator de Inibição de *Brettanomyces*.

A cinética de fermentação demonstrou que a inoculação de LEVEL2 SALVA™ não teve nenhum impacto negativo na duração da fermentação.

Em comparação com um grupo controle, LEVEL2 SALVA™ também foi capaz de inibir a *Brettanomyces bruxellensis* e limitar significativamente a produção de fenóis voláteis de 66 % a 91 %, dependendo do composto (Figura 4).

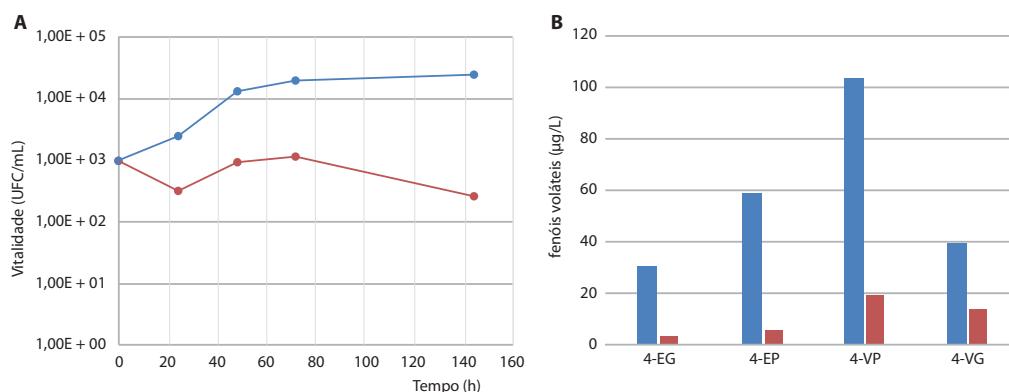


Figura 4. Produção de fenóis voláteis pela estirpe de *Brettanomyces bruxellensis* L0469 (CRBO, UMR 1366 Oeno): *Saccharomyces cerevisiae* (azul); LEVEL2 SALVA™ inoculada antes da *Saccharomyces cerevisiae* (vermelho). 1 L de Syrah na fase líquida (239,6 g/L de açúcar; 144 mg/L de NFA; pH 3,34) a 24 °C.

A eficácia e especificidade de LEVEL2 SALVA™ para inibir a *Brettanomyces bruxellensis* foi comparada com duas estirpes de não-*Saccharomyces* NS2 e NS4 encontradas no mercado, com base nas referidas propriedades de bioproteção. Um grupo de controlo negativo sem qualquer não-*Saccharomyces* também foi testado, bem como com *Brettanomyces bruxellensis* isolada. Todas as fermentações atingiram a secura com acidez volátil <0.3g H₂SO₄/L (dados não mostrados).

Brettanomyces bruxellensis foi inoculada a 1x10³ UFC/mL e a sua viabilidade foi monitorizada durante as fermentações através do espalhamento em meio seletivo (Figura 5). A *Saccharomyces cerevisiae*, bem como a não-*Sacchaomyces* NS2 e NS4 não limitaram eficazmente o crescimento de *Brettanomyce*. LEVEL2 SALVA™ foi a única levedura capaz de reduzir a população de *Brettanomyces*.

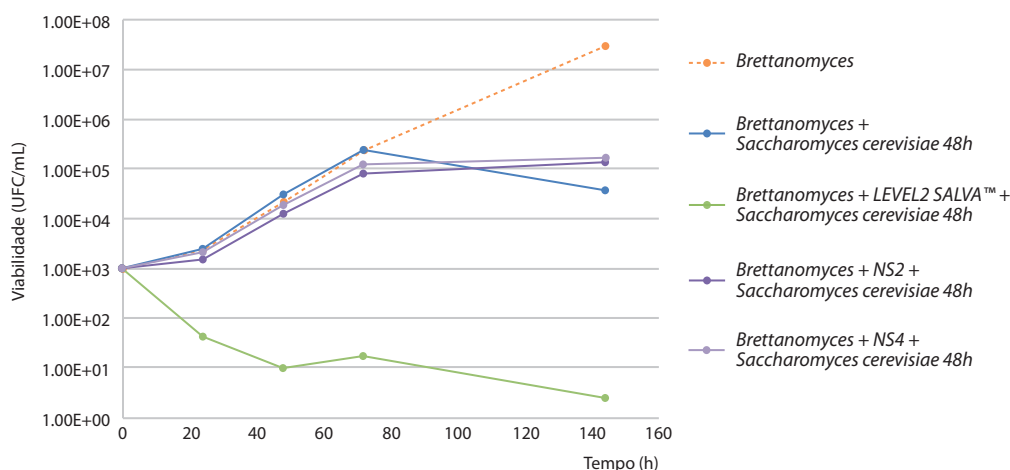


Figura 5. Viabilidade da estirpe *Brettanomyces bruxellensis* L0469 - Mosto de uva comercial a 24 °C

5. Ensaios piloto e à escala de adega: aumento de escala

Foram realizados inúmeros ensaios à escala piloto e à escala de adega em diferentes castas de uvas tintas (Merlot, Cabernet sauvignon, Syrah, Tempranillo, etc.) em França, Espanha, Itália e nos Estados Unidos. LEVEL2 SALVA™ foi inoculada em diferentes etapas pré-fermentativas do processo de vinificação, incluindo as uvas e o enchimento dos depósitos.

5.1 Contaminação recorrente de parcelas de vinhas

Numa adega na Columbia Gorge AVA, WA, EUA, problemas recorrentes de *Brettanomyces* foram identificados como provenientes de uvas que tiveram origem em parcelas específicas das suas vinhas. Foi realizado um ensaio com 50% de cachos desengaçados de Syrah desta parcela identificada e transferidos de forma homogênea para depósitos de madeira de 40 hL (mesmo fornecedor, mesma idade). Durante o enchimento dos depósitos foi adicionado SO₂ a 4g/hL. Posteriormente, LEVEL² SALVA™ foi inoculada num depósito em comparação com o depósito do grupo controlo sem adição. Os depósitos não foram homogeneizados durante 24h a 14 °C, antes da inoculação de *Saccharomyces cerevisiae*. Ambos os depósitos seguiram o mesmo processo de vinificação, e os vinhos foram analisados no final da fermentação malolática (FML). Os vinhos onde LEVEL² SALVA™ foi inoculada nas primeiras etapas apresentaram um nível muito baixo da população *Brettanomyces* (Figura 6).

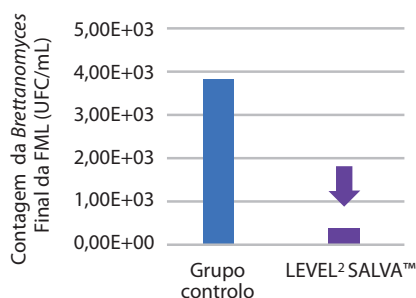


Figura 6. Análise após o final da FML Ensaio em adega, Syrah, Columbia Gorge AVA, Estados Unidos.

5.2 Adição de LEVEL² SALVA™ nas uvas após colheita

A levedura LEVEL² SALVA™ também pode ser aplicada nas etapas iniciais da elaboração do vinho, mais especificamente nas uvas após colheita. Foi realizado um ensaio em Espanha em que LEVEL² SALVA™ foi aplicada por pulverização em uvas Tempranillo colhidas manualmente, em comparação com uvas sem qualquer adição. O mesmo processo de vinificação foi aplicado para ambos os tratamentos. No final da FML, observámos que LEVEL² SALVA™ foi capaz de limitar eficientemente o desenvolvimento de *Brettanomyces* (Figura 7), diminuindo por um fator 2,4 a sua população.

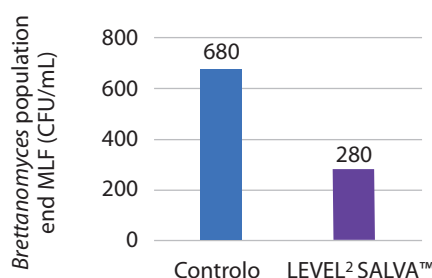


Figura 7. População *Brettanomyces* nos vinhos após a FML. Ensaio em adega num Tempranillo, Espanha. Comparação entre LEVEL² SALVA™ inoculada por pulverização nas uvas e um grupo de controlo sem tratamento.

5.3 Contaminação precoce de *Brettanomyces*: eficiência de LEVEL² SALVA™

Foi realizada uma experiência no laboratório de Microbiologia da Fundação Edmund March (San Michele all'Adige, Itália) em mosto líquido de uvas tintas (casta Rebo), inoculada com *Brettanomyces* a 1x10³ ufc/mL. O Controlo foi inoculado com *Saccharomyces cerevisiae* com temperatura de fermentação < 27°C. Paralelamente LEVEL² SALVA™ foi inoculada 48 horas antes da inoculação da *Saccharomyces cerevisiae*. No final da fermentação alcoólica verificou-se que o mosto inoculado com LEVEL² SALVA™ apresentava baixas concentrações de 4-etifenol e 4-etilguaicol em comparação com o controlo (figura 8).

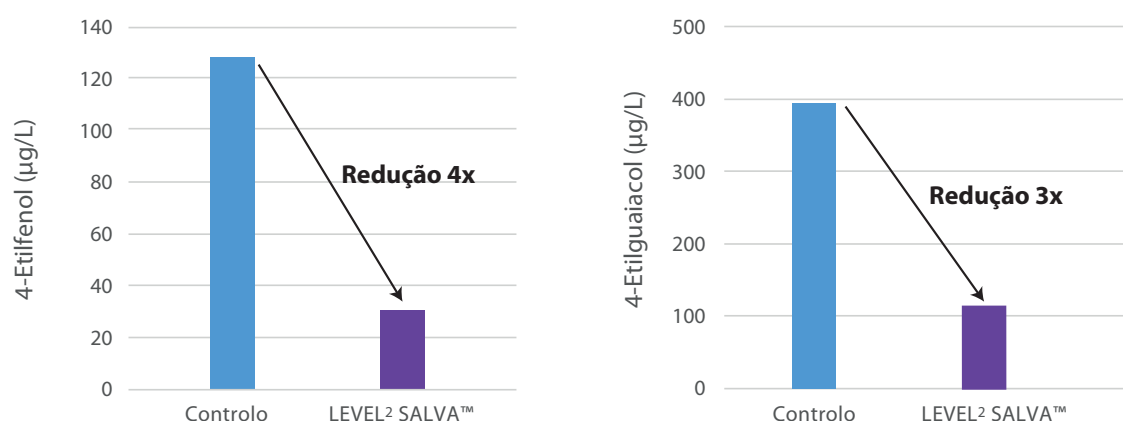


Figura 8. Produção de fenóis voláteis num mosto da casta Rebo com e sem LEVEL2 SALVA™ uma semana após o final da FML

5.4 Redução da utilização de SO₂ com LEVEL2 SALVA™

Foi realizada uma experiência com a Universidade de Estudos de Udine (Itália) com Cabernet Franc. Após o esmagamento e desengace, o mosto com películas foi dividido de forma homogênea em três cubas de 25 L, onde a *Brettanomyces* foi inoculada a 1×10^3 UFC/mL. Foram comparadas três condições experimentais: um controlo sem adição de SO₂, uma adição de 2,5 g/hL de SO₂ e uma adição de LEVEL2 SALVA™ sem SO₂ adicionado. No final da fermentação alcoólica, os fenóis voláteis foram analisados. Os níveis de 4-etilfenol e 4-etilguaiaicol foram superiores no controlo sem SO₂ e sem LEVEL2 SALVA™. Nesta experiência, a levedura LEVEL2 SALVA™ foi mais eficaz do que o SO₂, uma vez que atingiu o nível mais baixo de fenóis voláteis (Figura 9).

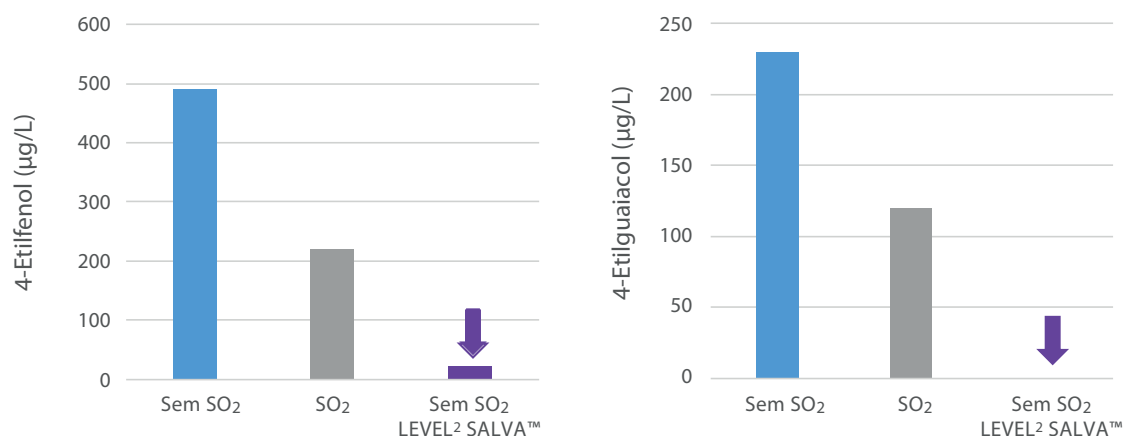


Figura 9. Fenóis voláteis em Cabernet Franc (Universidade de Estudos de Udine, Itália) sem SO₂, com adição de SO₂ e sem SO₂ mas com LEVEL2 SALVA™

Outro ensaio foi conduzido na casta Merlot, em Bordéus (França), comparando 5 g/hL de adição de SO₂ a uma adição de LEVEL2 SALVA™ (sem adição de SO₂), em ambos os casos foram adicionados no enchimento das cubas (tanques de aço inoxidável de 80 hL) antes de uma imersão a frio (3 dias a 10°C). Um acompanhamento em diferentes estágios (no final da FML e após 5 meses) mostrou uma presença de *Brettanomyces* no final da FML e um crescimento significativo após 5 meses, durante o envelhecimento, no controlo tratado com 5 g/hL de SO₂. Não foram detetadas *Brettanomyces* nos vinhos com LEVEL2 SALVA™, após a FML nem após 5 meses. Esta inibição de *Brettanomyces* pela levedura LEVEL2 SALVA™ foi correlacionada com a ausência de fenóis voláteis nos tratamentos com LEVEL2 SALVA™. (Figura 10).

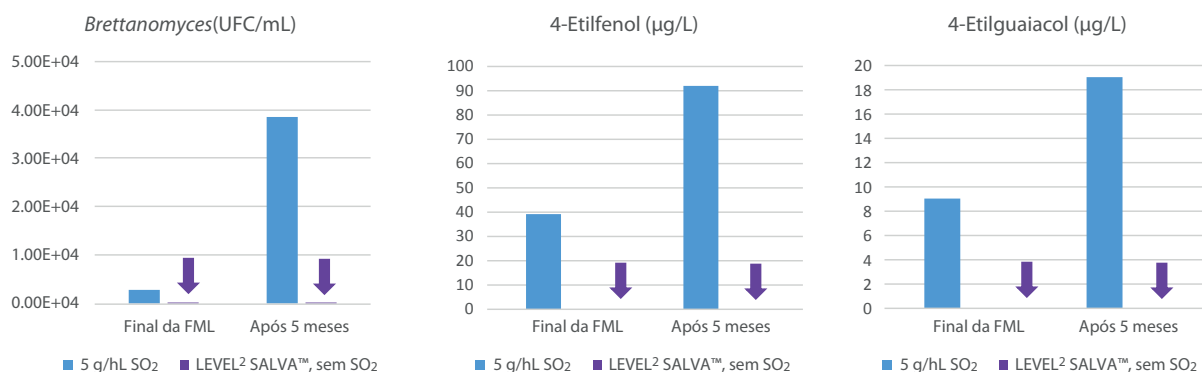


Figura 10. *Brettanomyces* e fenóis voláteis analisados em Merlot (Bordéus, França) com SO₂ e sem SO₂ mas com LEVEL² SALVA[™]

6. Uma abordagem de bioproteção integral para controlar a *Brettanomyces*

Mesmo em níveis abaixo do seu limiar de percepção, os fenóis voláteis podem ter um impacto negativo no perfil sensorial, reduzindo a percepção da fruta, mascarando a identidade do vinho, a sua assinatura e o seu *terroir*. Em concentrações mais altas, leva claramente a uma depreciação qualitativa do vinho, com a presença de defeitos óbvios. Diferentes soluções naturais a aplicar durante as diversas etapas de vinificação (desde as uvas até à maturação do vinho) podem auxiliar na gestão de contaminações de *Brettanomyces*. LEVEL² SALVA[™] é uma solução de bioproteção específica que complementa as soluções naturais existentes.

Na vinha, LALVIGNE BOTRYLESS[™] (quitosano de *Aspergillus niger*) aplicado no período pós-floração até à fase do pintor apresentou resultados interessantes para redução microrganismos de deterioração, incluindo a *Brettanomyces*.

Em adega, LEVEL² SALVA[™] é uma solução natural inovadora para prevenir a contaminação de *Brettanomyces* desde as etapas iniciais (uvas, antes do transporte, na recepção, etc.). LEVEL² SALVA[™] produz um Fator de inibição de *Brettanomyces* específico destruindo a parede celular desta levedura de contaminação. Uma inoculação precoce de uma *Saccharomyces cerevisiae* selecionada e uma fermentação alcoólica "limpa" e bem gerida assumirá o controlo para ocupar o espaço microbológico e evitar o desenvolvimento de *Brettanomyces*. A inoculação com bactérias selecionadas também é fundamental no processo de vinificação. A utilização de *Lactiplantibacillus plantarum* ML Prime[™] resultará numa estabilização precoce dos vinhos, enquanto uma bactéria *Oenococcus oeni* tem um efeito direto no controlo da população *Brettanomyces* e impede a produção de fenóis voláteis. Dependendo da viabilidade do processo de vinificação e dos objetivos do enólogo, tanto a co-inoculação quanto as inoculações sequenciais podem ser interessantes. NO BRETT INSIDE[™] (solução à base de quitosano) também é uma excelente ferramenta curativa no caso do desenvolvimento de *Brettanomyces* durante a maturação. A combinação dessas alternativas naturais ao sulfito oferece boas oportunidades naturais aos enólogos quando se trata de gerir as contaminações de *Brettanomyces* e mitigar as suas consequências na qualidade do vinho, preservando sua assinatura e a identidade do *terroir* do vinho.

Conclusão

Este artigo demonstra a eficácia da nova levedura não-*Saccharomyces* LEVEL² SALVA[™] atuando como um agente de bioproteção específico contra a *Brettanomyces bruxellensis* nas fases pré-fermentativas da elaboração do vinho. O mecanismo de inibição, impulsionado pelo Fator de Inibição da *Brettanomyces* Spk1, degrada efetivamente a parede celular das *Brettanomyces*, diminuindo significativamente a sua população. Ensaios Laboratoriais e ensaios pilotos confirmam que LEVEL² SALVA[™] reduz

significativamente a produção de fenóis voláteis, o que é crucial para manter a qualidade do vinho. Os ensaios também destacam a versatilidade da levedura LEVEL² SALVA™, mostrando a sua eficácia quando aplicada em várias etapas do processo de vinificação, inclusive em uvas após colheita e durante o enchimento das cubas. Além disso, a redução da utilização de SO₂ sem comprometer a estabilidade do vinho realça o potencial de LEVEL² SALVA™ apresentando-a como uma alternativa sustentável na vinificação. Globalmente, LEVEL² SALVA™ oferece uma solução robusta e natural para gerir a contaminação de *Brettanomyces*, alinhando-se com o movimento do setor vitivinícola no sentido de reduzir os *inputs* de químicos e promover a conservação da qualidade do vinho.

Referências

Avramova, Marta; Cibrario, Alice; Peltier, Emilien; Coton, Monika; Coton, Emmanuel; Schacherer, Joseph et al. (2018) *Brettanomyces bruxellensis* population survey reveals a diploid-triploid complex structured according to substrate of isolation and geographical distribution. In : Scientific reports, vol. 8, n° 1, p. 4136.

Comitini, Francesca; Ingeniis, Jessica de; Pepe, Laura; Mannazzu, Ilaria; Ciani, Maurizio (2004) *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. In : FEMS microbiology letters, vol. 238, n° 1, p. 235–240.

Institut Français de la Vigne et du Vin. Descripteurs sensoriels et références chimiques - IFV Occitanie

Kuchen, Benjamín; Maturano, Yolanda Paola; Mestre, María Victoria; Combina, Mariana; Toro, María Eugenia; Vazquez, Fabio (2019) Selection of Native Non-*Saccharomyces* Yeasts with Biocontrol Activity against Spoilage Yeasts in Order to Produce Healthy Regional Wines. In : Fermentation, vol. 5, n° 3, p. 60.

Mehlomakulu, N. N.; Prior, K. J.; Setati, M. E.; Divol, B. (2017) *Candida pyralidae* killer toxin disrupts the cell wall of *Brettanomyces bruxellensis* in red grape juice. In : Journal of applied microbiology, vol. 122, n° 3, p. 747–758.

Mehlomakulu, Ngwekazi N.; Setati, Mathabatha E.; Divol, Benoit (2014) Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. In : International journal of food microbiology, vol. 188, p. 83–91.

Mewa-Ngongang, Maxwell; Du Plessis, Heinrich W.; Ntwampe, Seteno Karabo Obed; Chidi, Boredi Silas; Hutchinson, Ucrecia Faith; Mekuto, Lukhanyo; Jolly, Neil Paul (2019) The Use of *Candida pyralidae* and *Pichia kluyveri* to Control Spoilage Microorganisms of Raw Fruits Used for Beverage Production. In : Foods (Basel, Switzerland), vol. 8, n° 10.

Oro, L.; Ciani, M.; Comitini, F. (2014) Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. In : Journal of applied microbiology, vol. 116, n° 5, p. 1209–1217.

Oro, Lucia; Canonico, Laura; Marinelli, Valentina; Ciani, Maurizio; Comitini, Francesca (2019) Occurrence of *Brettanomyces bruxellensis* on Grape Berries and in Related Winemaking Cellar. In : Frontiers in microbiology, vol. 10, p. 415.

Peña, Rubén; Ganga, María Angélica (2019) Novel antimicrobial peptides produced by *Candida intermedia* LAMAP1790 active against the wine-spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. In : Antonie van Leeuwenhoek, vol. 112, n° 2, p. 297–304.



Pigao, Kevin; O'Donnell, Ryan; Osborne, James; Curtin, Chris (2021) Enrichment of *Brettanomyces* and Other Non-*Saccharomyces* Fermentative Yeasts from Vineyard Samples in Oregon. In : American Journal of Enology and Viticulture, vol. 72, n° 3, p. 257–266.

Renouf, Vincent; Lonvaud-Funel, Aline (2007) Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. In : Microbiological research, vol. 162, n° 2, p. 154–167.

Zieff, Stellenbosch University, 2022, Master Thesis, Evaluating *Suomyces pyralidae*'s bioprotection activity against *Brettanomyces bruxellensis* under winemaking conditions