

## Evaluation of Isolated Yeasts from Grapes of Pinto Bandeira Region, Bento Gonçalves (RS) in relation to Production of H<sub>2</sub>S and Fermentation Rate

### 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

Títulos abreviados:

Wine yeast Characterization

Caracterização de Leveduras Vínicas

Samarina Rodrigues Wlodarczyk<sup>1</sup>, Roberta Cristina de Souza<sup>2</sup>, Tania M.B. Bonfim<sup>3</sup>,  
Débora Brand<sup>4</sup>, Gildo Almeida da Silva<sup>5</sup>

#### ABSTRACT

The H<sub>2</sub>S production by yeasts is a frequent problem during the winemaking process. Hydrogen sulfide is a gas that produces the characteristic smell of rotten eggs. Therefore, it is important to select *Saccharomyces cerevisiae* strains that do not liberate H<sub>2</sub>S during wine fermentation resulting in off-flavor in wine. The goal of this work was to evaluate the yeasts isolated from the cultivars Cabernet Franc, Tannat and Ancellotta from the Pinto Bandeira Region, Bento Gonçalves (RS) in relation to the evolution of H<sub>2</sub>S and their fermentation skill. Lead (II) acetate paper was used to *detect the production of hydrogen sulfide* by 120 yeast strains. The fermentation ability of these strains was measured by gravimetry. All yeast strains with strong *fermentation capacity* did not produce H<sub>2</sub>S, representing 13.3%. Only one of these strains produced H<sub>2</sub>S in relatively *small quantities* in two of the three test tubes. High H<sub>2</sub>S formation was found in 35.8% of strains. These strains were also characterized by low fermentation capacity. Only 16 strains have showed potential to elaborate wines without off-flavour provoked by H<sub>2</sub>S.

**Keywords:** Yeast Selection; H<sub>2</sub>S; fermentation.

#### RESUMO

A produção de sulfeto de hidrogênio por leveduras é um problema frequente durante a elaboração de vinhos. O sulfeto de hidrogênio é um gás que produz o odor característico de ovos podres. Portanto, é importante selecionar linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que não liberem sulfeto de hidrogênio durante a fermentação, e assim não formar aromas indesejáveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar as leveduras isoladas das cultivares Cabernet Franc, Tannat e Ancellotta da região de Pinto Bandeira, Bento Gonçalves (RS) em relação à formação de sulfeto de hidrogênio e capacidade de fermentação. Papel embebido em acetato de chumbo foi utilizado para detectar a produção de sulfeto de hidrogênio em 120 linhagens. A capacidade fermentativa foi medida por gravimetria. Todas as linhagens com alta taxa de fermentação não produziram sulfeto de hidrogênio, representando 13,3%. Apenas uma destas formou sulfeto de hidrogênio em pequena quantidade em dois dos três tubos. Alta produção de sulfeto de hidrogênio foi encontrada em 35,8% das linhagens isoladas. Estas também foram caracterizadas por baixa capacidade fermentativa. Somente 16 linhagens mostraram potencial para elaborar vinhos sem aromas desagradáveis provocados pelo H<sub>2</sub>S.

**Palavras-chave:** Seleção de leveduras; H<sub>2</sub>S; fermentação.

Universidade Federal do Paraná (UFPR)

<sup>1</sup> samawlod@gmail.com

<sup>2</sup> robertacristina89@hotmail.com

<sup>3</sup> tbordinbonfim@gmail.com

<sup>4</sup> dbrand@ufpr.br

<sup>5</sup> gildo@cnpv.embrapa.br - Embrapa

## INTRODUÇÃO

O sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) é um composto indesejável no vinho por estar relacionado com a formação de odores desagradáveis. A produção deste gás ocorre por via enzimática e está relacionada com redução de sulfato exógeno (UGLIANO; KOLOUCHOVA; HENSCHKE, 2009). A remoção do  $H_2S$  do vinho é complexa e problemática, por isso, é fundamental que, na elaboração de vinho sejam empregadas linhagens com capacidade de efetuar uma rápida combinação do  $H_2S$  formado com precursores nitrogenados ou com deficiência na atividade da sulfito redutase. O uso de tais leveduras, apresentando elevada capacidade fermentativa, tem se mostrado uma solução eficaz (SILVA; SILVA, 1987). A preferência por linhagens autóctones é outro ponto a ser considerado, visto que além de estarem mais adaptadas ao substrato e ao ambiente de vinificação, garantem a manutenção das características típicas dos vinhos de uma determinada região (LOPES et al., 2007; CALLEJON et al., 2010). Portanto, o presente trabalho teve por objetivo determinar o potencial das leveduras autóctones da região de Pinto Bandeira, Bento Gonçalves (RS) com relação à elaboração de vinhos, ressaltando a deficiência em formar  $H_2S$  e uma expressiva velocidade de fermentação.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram isoladas 120 leveduras das cultivares de uva Cabernet Franc, Ancellotta e Tannat de vinhedos da região de Pinto Bandeira, Bento Gonçalves (RS) na safra de 2012. As amostras foram submetidas à diluição em série, seguida de plaqueamento em mosto ágar sem azul de metileno. O isolamento foi efetuado no mesmo meio entre 24 e 48 horas após o plaqueamento e crescimento a 24°C por 24 horas (SILVA; SILVA, 1987; SILVA, 1996).

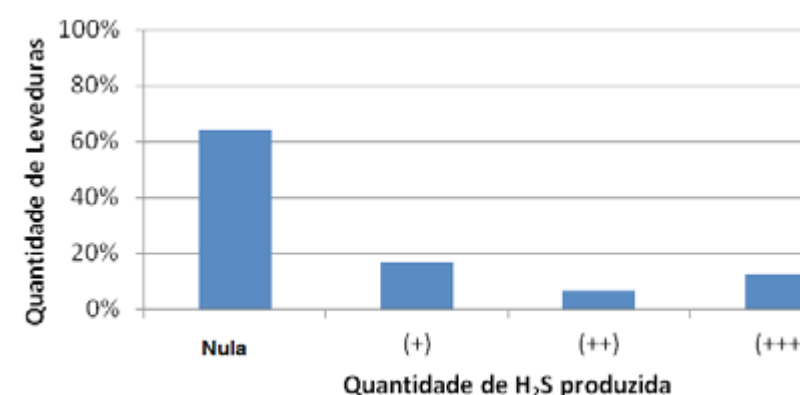
A produção de  $H_2S$  foi acompanhada usando papel de filtro impregnado com solução de acetato de chumbo 3,0% (SILVA; SILVA, 1984). Foram utilizadas duas linhagens testemunhas, Embrapa 1vvt/97 como controle negativo, e a comercial K1 (Lallemand) como controle positivo. Os tubos foram mantidos em estufa na temperatura de 24°C e a avaliação da evolução de  $H_2S$  foi monitorada por 96 horas com intervalo de 6 e 18 horas. A capacidade fermentativa foi monitorada pelo método gravimétrico (GIUDICI; ZAMBONELLI, 1992; LONGO et al., 1992;

SILVA et al., 2011). A avaliação foi efetuada durante 96 horas com intervalo de 6 e 18 horas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 120 microrganismos isolados 35,8% apresentaram desprendimento de  $H_2S$ , sendo considerados positivos para os testes os que formaram o gás em pelo menos 2 dos 3 tubos testados. Como demonstrado na Figura 1, a maioria das linhagens isoladas não produziram  $H_2S$  (64,2%). Das linhagens produtoras de  $H_2S$ , as que foram baixas, médias e altas concentrações representam, respectivamente, 16,7%, 6,7% e 12,5%. É conhecido que as linhagens produtoras do  $H_2S$  necessitam da presença das enzimas da via de redução do sulfato, e a repressão ou expressão destas enzimas está relacionada com a quantidade de  $H_2S$  formado (BUTZK; PARK, 2011). Além disso, a composição do mosto pode influenciar a produção de  $H_2S$  pela presença de nitrogênio assimilável. O metabolismo de aminoácidos que contém enxofre, como a metionina e a cisteína, pode resultar em produção acentuada de sulfeto de hidrogênio se não houver presentes no meio precursores nitrogenados destes aminoácidos prontos para reagir enzimaticamente com o  $H_2S$  formado pela levedura (CORDEnte et al., 2009).

Figura 1- Produção de  $H_2S$  por linhagens isoladas



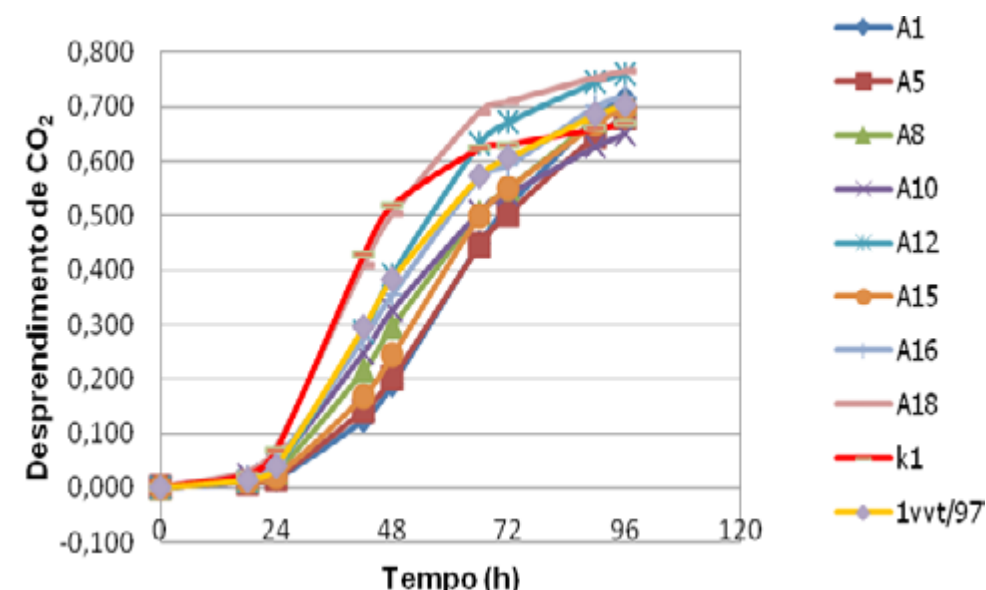
A frequência de linhagens produtoras de  $H_2S$  pareceu variar de acordo com a origem das leveduras com relação ao cultivar. Cabernet Franc, Ancellotta e Tannat apresentaram produção de, respectivamente, 65,0%, 32,5% e 10,0%.

Estudos realizados com a cultivar Cabernet Franc mostraram um percentual mais elevado (79,2%) (SILVA, 1999). Da mesma forma, uma pesquisa com o cultivar Cabernet Sauvignon, coletada na mesma região, mostrou que em 70,0% das linhagens isoladas produziram  $H_2S$  (SILVA; DALARMI, 2003). Linhagens isoladas de cultivares da região demarcada do Douro em Portugal, mostraram valores ainda mais elevados para leveduras fortes produtoras de  $H_2S$  (90,3%). Apenas 25 das 259 mostraram baixa atividade da sulfito redutase (NETO, MENDES-FERREIRA, 2005). A variação encontrada na frequência pode ser explicada pela composição química dos diferentes cultivares, a qual privilegiou determinados tipos de microrganismos. Pode ainda ser justificada pelo tipo de tratamento fitossanitário recebido por cada cultivar, o que também explicaria a variação nas frequências encontradas em outras regiões.

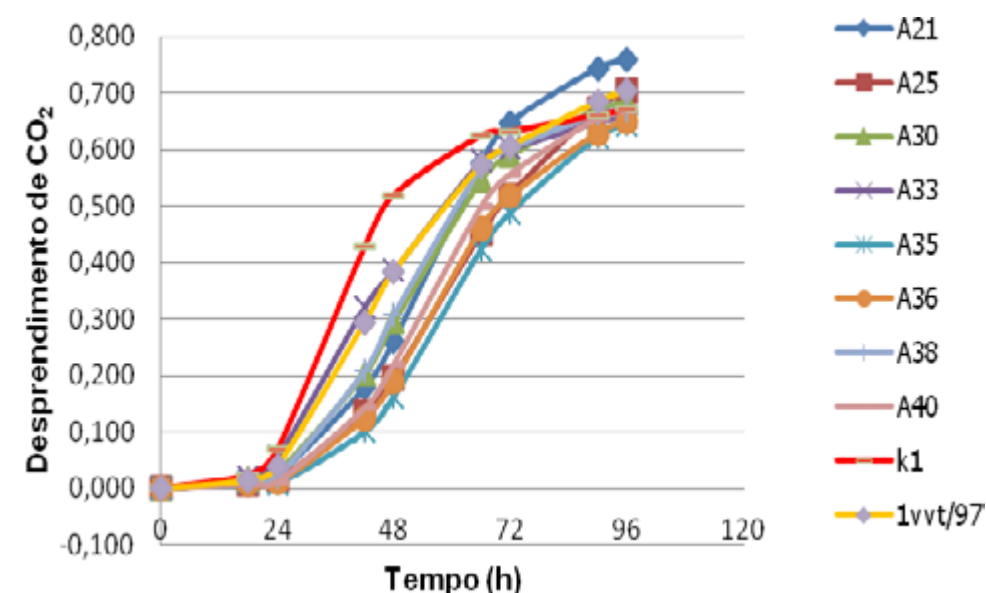
Os resultados obtidos neste trabalho indicam que 64,0% das linhagens isoladas apresentaram atividade extremamente baixa da enzima sulfito redutase ou promovem a rápida combinação do  $H_2S$  formado com precursores nitrogenados.

A boa capacidade fermentativa, indispensável para elaboração de vinho, foi observada apenas em linhagens isoladas a partir da cultivar Ancellotta. Destas, 40,0% apresentaram velocidade de fermentação similar a dos padrões da *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 1vvt/97 e K1 (Lallemand) e apenas uma produziu, embora em pequenas quantidades,  $H_2S$ , não apresentando risco à qualidade do vinho elaborado. Portanto, 13,3% das linhagens isoladas unem os atributos de alta velocidade de fermentação, representada pelas Figuras 2 e 3, e baixa atividade da sulfito redutase. As demais, incluindo as produtoras de  $H_2S$ , apresentaram baixa atividade fermentativa.

**Figura 2-** Velocidade de fermentação de linhagens mais promissoras isoladas a partir da cultivar Ancellotta representando as linhagens de A1 a A18. As linhagens 1vvt/97 e K1, indicadas pelas setas, foram utilizadas como padrões.



**Figura 3-** Velocidade de fermentação de linhagens mais promissoras isoladas a partir da cultivar Ancellotta representando as linhagens de A21 a A40. As linhagens 1vvt/97 e K1, indicadas pelas setas, foram utilizadas como padrões.



## CONCLUSÕES

Embora as linhagens que formam H<sub>2</sub>S possuam atividade fermentativa baixa, estas têm o potencial de comprometer a qualidade do vinho. Considerando a nula ou baixa produção de H<sub>2</sub>S e a alta velocidade de fermentação, 16 linhagens, isoladas apenas da cultivar Ancellotta, possuem potencial para a elaboração de vinhos. Nem sempre as leveduras presentes nas bagas das uvas apresentam aptidão para a elaboração de vinhos.

## REFERÊNCIAS

- BUTZKE, C.; PARK, S.K. Impact of fermentation rate changes on potential hydrogen sulfide concentrations in wine. **J. Microbil. Biotechnology**, v.21, p.519-524, 2011.
- CALLEJON, R.M.; CLAVIJO, A.; ORTIGUEIRA, P.; TRANCOSO, A.M.; PANEQUE, P.; MORALES, M.L. Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains, **Analytica Chimica Acta**, v.660, p. 68-75, 2010.
- CORDENTE, A.G.; HEINRICH, A.; PRETORIUS, I.S.; SWIEGERS, J. Isolation of sulfide reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p.446-459, 2009.
- GIUDICI, P.; ZAMBONELLI, C. Biometric and genetic study on acetic acid production for breeding of wine yeast. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.43, n.4, p.370-374, 1992.
- LONGO, E.; CANSADO, J.; SIEIRO, C.; CALO, P.; VELÁZQUEZ, J.B.; VILLA, T.G. Influence of the curing killer phenotype in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains on the fermentative behaviour. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.8, n.2, p. 147-150, 1992.
- LOPES, C.A.; RODRÍGUEZ, M.E.; SANGORRÍN, M.; QUEROL, A.; CABALLERO, A.C. Patagonian wines: the selection of an indigenous yeast starter. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.34, p. 539-546, 2007.
- NETO, L.; MENDES-FERREIRA, A.A. Pesquisa de atividade sulfito redutase em leveduras de origem enológica. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.25, n.2, p.275-278, 2005.
- SILVA, G.A.da; DALARMI, L. Comportamento das leveduras isoladas de uvas Cabernet sauvignon do Vale dos Vinhedos na safra 2003. In: X CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 2003, Bento Gonçalves. **Anais**. Bento Gonçalves: Embrapa, 2003. p.214.
- SILVA, G.A. da; POLETTO, C.M.; POLI, J.S.; VALENTE, P. Influence of *Brettanomyces custersianus* upon the activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the tumultuous phase of vinification. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v.54, n.2, p.347-356, 2011.
- SILVA, G.A. da; SILVA, M.A.A.A. da. Determinação Qualitativa da produção de sulfeto de hidrogênio. **Tecnologias geradas pelo sistema Embrapa**, Bento Gonçalves: UEPAE de Bento Gonçalves, 1984.
- SILVA, M.A.A.A. da; SILVA, G. A.da; Leveduras nacionais selecionadas para a elaboração de vinho. **Circular Técnica- Embrapa Uva e Vinho**, n.14, 1987.
- SILVA, G.A. da. 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. da. Comportamento de leveduras isoladas no vale dos vinhedos em Bento Gonçalves, RS, com relação à atividade killer. In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 1999, Bento Gonçalves. **Anais**. Bento Gonçalves: Embrapa, 1999. p. 170.
- UGLIANO, M.; KOLOUCHOVA, R.; HENSCHKE, P.A. Occurrence of hydrogen sulfide in wine and in fermentation: influence of yeast strain and supplementation of yeast available nitrogen. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.38, p. 423-429, 2009.