



## **Microbiologia geral do caráter Brett em vinhos**

### **Relações sinérgicas entre bactérias lácticas e a levedura contaminante *Brettanomyces bruxellensis***

Ana Sofia Dinis da Luz

#### **Orientadores**

Professora Doutora Cristina Maria Baptista dos Santos Pintado

Professor Doutor Antonio Tomás Palacios García

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciatura em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Cristina Maria Baptista dos Santos Pintado, do Instituto Politécnico de Castelo Branco e do Doutor Antonio Palacios García do Laboratórios Excell Ibérica. S.L.

**Setembro, 2023**



## Agradecimentos

Gostaria de dirigir os meus agradecimentos à empresa Excell Ibérica S.L., em particular ao Doutor Antonio Palacios García, Diretor Geral, e à Ixone Borinaga Santamaría, responsável, à data, do laboratório de Microbiologia pela oportunidade de estágio.

À professora Doutora Cristina dos Santos Pintado, pelo apoio, disponibilidade e orientação científica prestada ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores e também investigadores com quem me cruzei ao longo deste percurso académico que me transmitiram conhecimentos, os quais aplicarei sempre a favor do progresso e desenvolvimento.

Um agradecimento em especial ao meu avô Manuel† e à minha avó Maria pelo aprendizado, apoio e dedicação para que eu me tornasse o que sou hoje.

Aos meus pais Ana Maria e Jorge Luz, pela ajuda incondicional e pelas palavras de conforto ditas no tempo certo.

A ti, por nunca me teres abandonado e me permitires ouvir a palavra “tia”.

Aos meus amigos, em especial à Catarina e à Rita, por me terem acompanhado sempre de mão estendida.

Por último, a todos que participaram, direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizagem.



## Microbiologia geral do caráter Brett em vinhos

### Relações sinérgicas entre bactérias lácticas e a levedura contaminante *Brettanomyces bruxellensis*

Ana Sofia Dinis da Luz

## Resumo

O vinho compreende entre si uma complexa ecologia microbiana de microrganismos oportunistas e não só. Alguns microrganismos presentes podem resultar na deterioração do produto final e ter elevadas consequências descontroladas a nível económico. A presença de leveduras do género *Brettanomyces bruxellensis*, que confere aos vinhos um caráter conhecido como "Brett", é caracterizada por originar aromas de animais, o que por sua vez, indica um fator negativo do ponto de vista sensorial, tanto a nível aromático quanto da estabilidade da cor. A nível cromatográfico, sabe-se que as leveduras do género *Brettanomyces* podem provocar no vinho alterações importantes como por exemplo a produção de fenóis voláteis. No entanto, a cromatografia tem outros parâmetros de análise interessantes os quais estão relacionados com a presença de alguns microrganismos. Desta forma, surge uma questão que se torna pertinente relativamente a um composto químico conhecido por ácido isovalérico, cuja presença provoca aromas de animais. Está cientificamente comprovado que a presença do ácido isovalérico nos vinhos, pode ser provocada pelas leveduras do género *Brettanomyces*. No entanto, têm vindo a surgir algumas questões pertinentes relacionadas com este tema dando hipótese à possibilidade de outros microrganismos presentes no vinho serem igualmente capazes de produzir este composto químico, como por exemplo as bactérias do ácido láctico.

As questões levantadas anteriormente fizeram com que surgisse uma pesquisa mais profunda sobre as bactérias do ácido láctico no vinho. Existe uma vasta informação científica sobre a sua função no processo de vinificação, porém pouco se sabe relativamente à sua relação com o ácido isovalérico. Até aos dias de hoje, no mundo do vinho, ainda não existem dados científicos que garantam que a presença do ácido isovalérico pode ser produzido pelas bactérias lácticas. Deste modo, e sabendo a capacidade que este tipo de bactérias tem em produzir este composto químico noutros alimentos, surgiu a possibilidade de realizar este estudo nos vinhos.

Para este estudo foram avaliadas 55 amostras provenientes de adegas diferentes recolhidas entre os meses de fevereiro a maio de 2023. As amostras deste estudo foram analisadas no Laboratório de Microbiologia do Laboratório Excell Ibérica, S.L. recorrendo à análise em meio de cultura para as bactérias lácticas e a uma técnica de Microbiologia Molecular: PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para quantificar as

leveduras do género *Brettanomyces*. Em paralelo, foram realizadas análises cromatográficas (fenóis voláteis e ácido isovalérico), cujos resultados foram cedidos pelo Departamento de Análises Cromatográficas, presente no mesmo laboratório.

Os resultados mostraram a existência de amostras em que foi revelada a ausência de leveduras contaminantes do género *Brettanomyces* e conseqüentemente ausência de etilfenóis mas que apresentaram ácido isovalérico e bactérias lácticas na sua constituição, o que sugere o papel destas últimas na produção de ácido isovalérico.

## **Palavras-chave**

Ácido isovalérico; Análises microbiológicas; Deterioração do vinho;

## Microbiología general del carácter Brett en los vinos

### Relaciones sinérgicas entre las bacterias lácticas y la levadura contaminante *Brettanomyces bruxellensis*

Ana Sofia Dinis da Luz

## Resumen

El vino muestra una ecología microbiana compleja de microorganismos que comprende entre otros algunos oportunistas. Algunos microorganismos presentes en el vino pueden dar lugar al deterioro del producto final y tener grandes consecuencias a nivel económico. La presencia de levaduras del género *Brettanomyces bruxellensis*, que confiere a los vinos un carácter conocido como "Brett", se caracteriza por originar aromas animales, lo que a su vez, indica un factor negativo desde el punto de vista sensorial, tanto en términos de estabilidad aromática y de color. A nivel cromatográfico, se sabe que las levaduras del género *Brettanomyces* pueden provocar alteraciones importantes en el vino, como la producción de fenoles volátiles. Sin embargo, existen otros compuestos químicos relacionados con la presencia de microorganismos oportunistas en el vino que pueden ser analizados también por cromatografía. En este sentido, cobra relevancia el compuesto químico ácido isovalérico, cuya presencia provoca aromas animales. Está científicamente comprobado que la presencia de ácido isovalérico en los vinos puede ser provocada por levaduras del género *Brettanomyces*. Sin embargo, algunas hipótesis apuntan a que las bacterias del ácido láctico también pueden ser capaces de producir este compuesto químico.

En base a esta hipótesis, se ha realizado una investigación más profunda sobre las bacterias del ácido láctico en el vino. Hay mucha información científica sobre su papel en el proceso de elaboración del vino, pero poco se sabe sobre su relación con el ácido isovalérico. Hasta el día de hoy, en el mundo del vino, todavía no hay datos científicos que avalen que la presencia de ácido isovalérico pueda ser producida por bacterias lácticas. De esta forma, y conociendo la capacidad de este tipo de bacterias para producir este compuesto químico en otros alimentos, surgió la posibilidad de realizar este estudio en vinos.

Para este estudio se evaluaron 55 muestras de diferentes bodegas recogidas entre los meses de febrero y mayo de 2023. Las muestras de este estudio se analizaron en el Laboratorio de Microbiología de Excell Ibérica, S.L. recurriendo al análisis en medio de cultivo para bacterias ácido lácticas y una técnica de Microbiología Molecular: PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para cuantificar levaduras del género *Brettanomyces*. Paralelamente, se realizaron análisis cromatográficos (fenoles volátiles y ácido isovalérico), cuyos resultados fueron cedidos por el Departamento de Análisis Cromatográfico, presente en el mismo laboratorio.

Los resultados mostraron que curiosamente había muestras en las que se revelaba la ausencia de levaduras contaminantes del género *Brettanomyces* y consecuentemente la ausencia de etilfenoles, pero que presentaban ácido isovalérico y bacterias lácticas en su constitución. Esto sugiere un papel de este último en la producción de ácido isovalérico.

### **Palabras claves**

Ácido isovalérico; Análisis microbiológicos; Degradación del vino;

# Índice Geral

Agradecimentos.....	III
Resumo.....	V
Resumen .....	VII
Índice de figuras .....	XI
Lista de tabelas.....	XIII
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos.....	XV
1. Introdução.....	1
2. O Vinho .....	3
2.1. Processo de vinificação .....	3
2.2. Alterações e controlo microbiológico no vinho .....	5
2.3. <i>Brettanomyces bruxellensis</i> no vinho .....	7
2.4. Bactérias do ácido láctico nos vinhos .....	8
2.5. Fermentação malolática.....	10
3. Material e Métodos .....	13
3.1. Local de estágio .....	13
3.2. Características das amostras.....	13
3.3. Análises microbiológicas .....	14
3.3.1. Contagem de bactérias lácticas por métodos culturais.....	14
3.3.2. PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	16
3.4. Observação microscópica de microrganismos.....	18
3.5. Atividades complementares.....	18
4. Resultados e Discussão .....	18
5. Conclusão .....	25
6. Referências Bibliográficas.....	26

## ANEXOS

Anexo 1 - Tabela de resultados microbiológicos e de biologia molecular para as 55 amostras estudadas



## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> - Processo geral de vinificação para vinhos tintos	4
<b>Figura 2</b> - Relação entre o composto 4-etilfenol e a levedura contaminante <i>Brettanomyces</i> entre os dias 1 e 24.	6
<b>Figura 3</b> - Observação microscópica de leveduras do género <i>Brettanomyces</i> (x1000)	7
<b>Figura 4</b> - Imagem ao microscópio eletrónico de <i>Oenococcus oeni</i>	9
<b>Figura 5</b> - Dinâmica das populações de BAL durante a produção de vinhos	10
<b>Figura 6</b> - Reação de descarboxilação do ácido málico em ácido láctico	11
<b>Figura 7</b> - Três principais consequências da FML	12
<b>Figura 8</b> - Esquema da análise microbiológica por filtração em membrana	14
<b>Figura 9</b> - Colónias de bactérias lácticas formadas sobre a membrana.	15
<b>Figura 10</b> - Equipamento de PCR em tempo real	17
<b>Figura 11</b> - Amostras positivas e negativas para BAL	20
<b>Figura 12</b> - Amostras com BAL + Ácido Isovalérico e amostras s/ <i>Brettanomyces</i>	20
<b>Figura 13</b> - Amostras com <i>Brettanomyces</i> e amostras s/ Etilfenóis	21
<b>Figura 14</b> - Bactérias lácticas com morfologia similar a <i>Oenococcus oeni</i>	22
<b>Figura 15</b> - Percentagem das BAL relativamente à sua morfologia	23
<b>Figura 16</b> - Percentagem das amostras PCR <i>Brettanomyces</i>	23



## Lista de tabelas

**Tabela 1** - Resultados PCR de bactérias lácticas a nove amostras (UG/mL) ..... 19

**Tabela 2** - Identificação de BAL relativamente à sua morfologia..... 22



## Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

4-EG – 4-Etilguaiacol

4-EF – 4-Etilfenol

BAA – Bactérias do ácido acético

BAL – Bactérias do ácido láctico

Bretta – *Brettanomyces*

CVNC - Células viáveis não cultiváveis

FML – Fermentação maloláctica

LQ – Limite de quantificação

ND – Não detetado

PCR - *Polymerase chain reaction*

UFC – Unidades formadoras de colónias

UG – Unidades genómicas