

Bioproteção em vinhos tintos com *Metschnikowia pulcherrima* LEVEL² GUARDIA™

Amandine Deroite, Anne Ortiz-Julien, Anthony Silvano,
José Maria Heras, Ann Dumont, Marion Bastien



Existem cada vez mais enólogos a reduzir a aplicação de sulfuroso nos vinhos como resposta à demanda dos consumidores. Recentemente foram desenvolvidas soluções biológicas alternativas designadas de bioprotetores, para controlo microbiológico de contaminantes e simultânea redução da utilização de SO₂. Um dos princípios de bioproteção baseia-se na gestão de populações microbianas prejudiciais, mais do que na sua erradicação. Por outro lado, ter uma alternativa como a bioproteção microbiológica pode ser uma opção interessante especialmente em contexto de aquecimento global onde o aumento de pH torna o sulfuroso menos eficiente.



Com o interesse contínuo na seleção de novas estirpes *Saccharomyces cerevisiae* e *Oenococcus oeni*, uma atenção particular tem sido dada à seleção de espécies/estirpes não-*Saccharomyces* para, entre outras coisas, conseguir uma capacidade de bioproteção natural contra leveduras e bactérias lesivas para a qualidade do vinho.

Uma das não-*Saccharomyces* estudadas é a *Metschnikowia pulcherrima*. Esta publicação centra-se na atividade antagonística de uma estirpe específica *M. pulcherrima* **LEVEL² Guardia™**, noutras espécies de leveduras enológicas para aplicações de bioproteção.

Esta publicação centra-se na **LEVEL² Guardia™**: Forte ação anti-microbiana em vinhos tintos

LEVEL² Guardia™ é a mais recente levedura *Metschnikowia pulcherrima* do nosso portefólio, tendo sido selecionada pelo Instituto Francês da Vinha e do Vinho na Borgonha, em França, pela sua capacidade de adaptação às etapas pré-fermentativas na produção de vinho tinto bem pelo controlo de outros microrganismos contaminantes.

Em mostos a **LEVEL² Guardia™** apresenta uma eficaz e rápida implantação e multiplicação e deste modo ocupa o meio «afastando» outras espécies, mesmo a baixas temperaturas. Como mostra a Figura 1, num Pinot noir 2020 (IFV Beaune, Borgonha, França), **LEVEL² Guardia™** foi capaz de multiplicar-se durante uma maceração a frio durante 5 dias (10°C). Consequentemente, no final dessa etapa pré fermentativa, assistiu-se a uma diminuição de leveduras de deterioração *Hanseniaspora uvarum* e de outras leveduras contaminantes em comparação com um controlo com adição de SO₂.

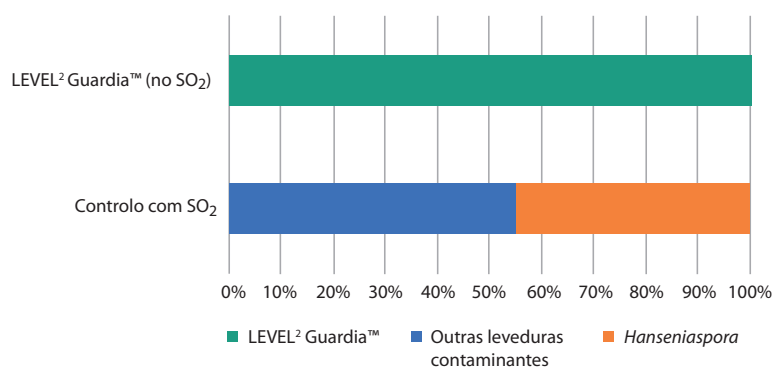


Figura 1. Contagem de levedura após 5 dias de maceração a frio (10°C) em Pinot Noir (IFV Beaune, França, 2020). Ensaio comparativo de **LEVEL² Guardia™** (10g/hL) e o controlo com uma adição de 2,5g /100 kg de SO₂.

Outro ensaio realizado em Grenache 2020 (INCAVI, Espanha) mostra a boa implantação de **LEVEL² Guardia™** com baixas temperaturas, e a sua elevada ação antimicrobiana contra as diferentes populações microbianas. Tal como no ensaio anterior, a inoculação de **LEVEL² Guardia™** foi analisada comparando a adição de SO₂ durante uma estabilização a frio a 10°C. Verificou-se uma boa implantação de **LEVEL² Guardia™** durante a maceração a frio, e os valores das outras espécies contaminantes, tais como a *Hanseniaspora*, reduziram significativamente (Figura 2). As duas cubas foram inoculadas com a mesma *Saccharomyces cerevisiae*. A acidez volátil no final da fermentação alcoólica (inoculados com a mesma *Saccharomyces cerevisiae*) foi significativamente mais baixa no vinho protegido com **Guardia** (Figura 3).

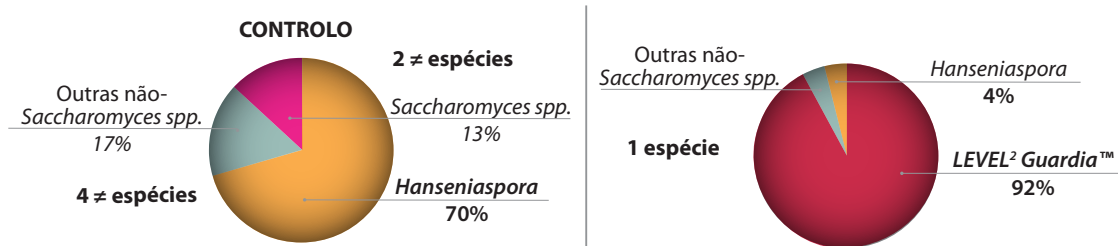


Figura 2. Controle da implantação durante 5 dias de maceração a frio (10°C) em Grenache (INCAVI, Espanha, 2020). Ensaio comparativo de LEVEL² Guardia™ (10g/hL) e um controle sem bioproteção. Não foram adicionados sulfitos durante o ensaio.

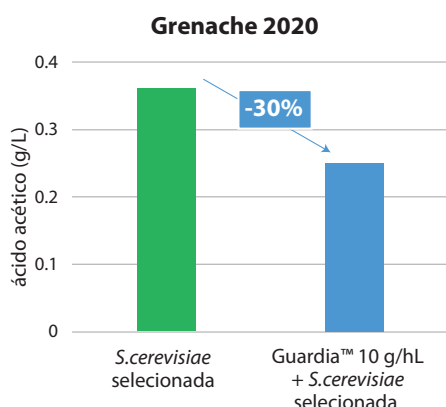


Figura 3. Acidez volátil em vinhos Grenache (INCAVI, Espanha, 2020). Ensaio comparando de LEVEL² Guardia™ (10g/hL) e um controle sem bioproteção. Não foram adicionados sulfitos durante o ensaio.

Porque é que a LEVEL² Guardia™ é um forte agente de bio proteção?

A *Metchnikowia pulcherrima* é um microrganismo interessante encontrado na flora do mosto e tal como no caso da *Saccharomyces cerevisiae*, dentro da mesma espécie, existem estirpes com comportamentos distintos por isso é importante selecionar a levedura adequada para cada aplicação específica.

O mecanismo de ação único desta estirpe de *M.pulcherrima* deve-se à sua capacidade de produção de ácido pulcerrimínico. O ácido pulcerrimínico é um ácido natural que não tem impacto sensorial, sendo produzido por algumas espécies de leveduras em particular a *M.pulcherrima* devido à presença dos genes (PUL1, PUL2, PUL4, snf2) que possibilitam a sua síntese. Após a excreção pela levedura, o ácido pulcerrimínico tem uma forte ligação quelante ao ferro livre formando-se o pulcerrimínio. (Figura 4).

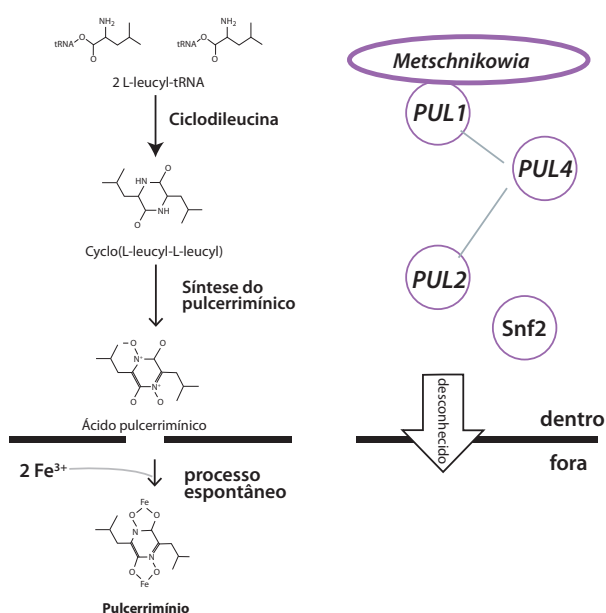


Figura 4. Biossíntese do pulcerrimínico da *M. pulcherrima* e da sua capacidade de neutralizar o ferro (Sipiczki, 2020).

O ferro presente no mosto é reduzido e o crescimento das espécies contaminantes (por exemplo, *Hanseniaspora*, etc.) acaba por diminuir dado que o ferro livre é um elemento necessário para o seu crescimento. A Figura 5 mostra as diferentes concentrações de ferro total e livre num mosto em que diferentes *M.pulcherrima* entre as quais **LEVEL² Guardia™** e uma *Saccharomyces cerevisiae* selecionada foram utilizadas.

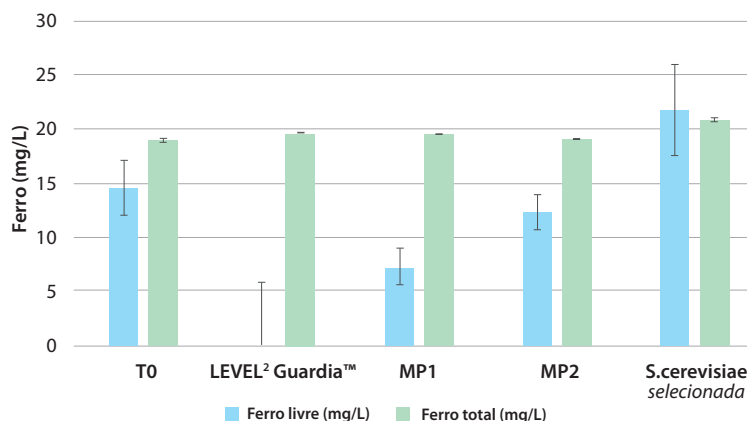
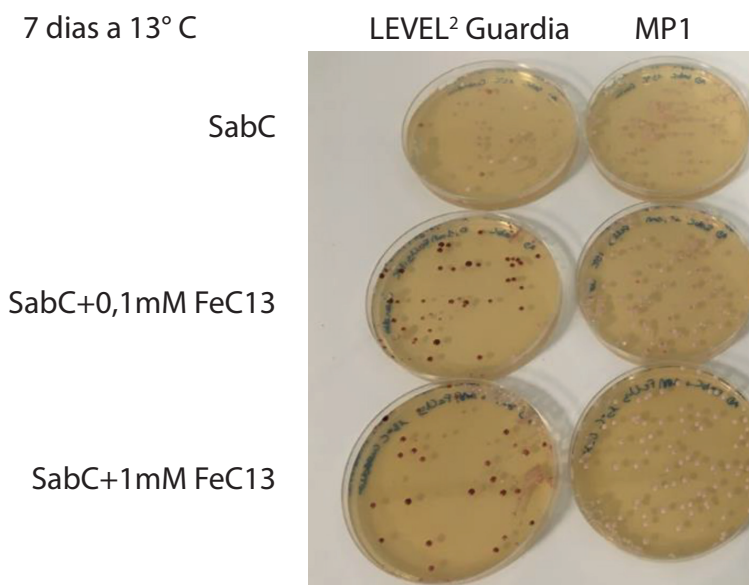


Figura 5. Concentração total e livre de ferro no mosto com diferentes *M.pulcherrima* e *S. cerevisiae*

Fenotipicamente falando, esta propriedade única pode ser observada quando **LEVEL² Guardia™** é cultivada num meio específico e as colónias resultantes dessa ação são rosas dado que o pulcerrimínio apresenta uma pigmentação vermelha (Figura 6).



Amandine Deroite 2021, Blagnac Lab Lallemand Oeno

Figura 6. **LEVEL² Guardia™** com incubação durante 7 dias a 13° C num meio específico com ferro comparado com outra *M.pulcherrima* (Laboratoire I&D Lallemand, França).

A associação positiva de **LEVEL² Guardia™™** e da levedura enológica *Saccharomyces cerevisiae*

Como a **LEVEL² Guardia™** é um forte quelante do ferro livre existente no mosto, e desta forma reduz o crescimento de outras espécies de levedura, seria de presumir que a atividade da *S. cerevisiae* necessária para completar a fermentação poderia ser inibida pela formação pulcerrimínio devido à redução do ferro no mosto. No entanto, a levedura enológica *S. cerevisiae* tem a capacidade de «quebrar» a ligação férrica ao ácido pulcherrímico e usá-lo para as suas funções metabólicas. Devido à presença no seu genoma dos genes PUL3 e PUL4 (Krause et al, 2018). Deste modo a levedura selecionada *S. cerevisiae* podem ser inoculadas após a **LEVEL² Guardia™**.

Por outro lado, a implantação da *S. cerevisiae* selecionada mostrou ser mais eficiente ainda quando **LEVEL² Guardia™** é inoculada antes da fermentação (Figura 7) provavelmente devido à forte limitação da flora contaminante.

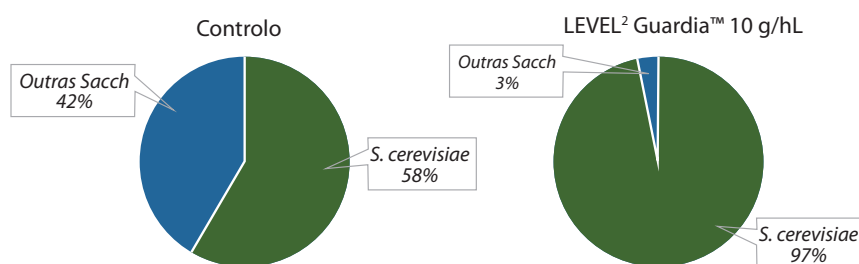


Figura 7. Controlo da implantação a meio da fermentação alcoólica em Grenache (INCAVI, Espanha, 2020). Ensaio comparativo de **LEVEL² Guardia™** (10 g/hL) e um controlo sem bioproteção. Não foram adicionados sulfitos durante o ensaio.

Conclusão

Durante a pré-fermentação, o mosto é vulnerável, estando sujeito ao desenvolvimento de microrganismos indesejáveis. A proteção do mosto é necessária para evitar desvios sensoriais desde as primeiras etapas da vinificação. A utilização de **LEVEL² Guardia™**, por exemplo durante a maceração a frio das uvas tintas, é uma alternativa eficiente ao SO₂ para o controlo de uma diversidade de microrganismos contaminantes.