

Efeito de vários factores ambientais no crescimento e produção de 4-Etilfenol por leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces*

I. S. Silva, A. L. Coelho, F. M. Campos, A. C. Ferreira, J. A. Couto, T. A. Hogg

Escola Superior de Biotecnologia - Universidade Católica Portuguesa
Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto; e-mail: silva.isa@netc.pt

SUMÁRIO

Foi estudado o efeito de alguns factores ambientais (pH, concentração de SO₂, etanol e de ácido *p*-cumárico) na produção de 4-etilfenol (4EF), usando ácido *p*-cumárico como substrato, por leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces*. Para as leveduras testadas (*D. bruxellensis* e *D. anomala*), o rendimento de conversão do ácido *p*-cumárico em 4EF foi constante, sugerindo uma possível relação linear entre a concentração inicial de substrato e a concentração final de produto. A níveis de pH compreendidos entre 3,0 e 4,0 a produção de 4EF não foi afectada significativamente. Concentrações de SO₂ molecular superiores a 0,15 mg/L inibem fortemente o crescimento e a produção de 4EF, em ambas as leveduras. No entanto, o efeito na produção de 4EF foi mais forte em *D. anomala* do que em *D. bruxellensis*, tendo esta continuado a produzir 4EF mesmo na presença de concentrações elevadas de SO₂.

INTRODUÇÃO

As leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces* estão normalmente associadas à deterioração de vinhos, especialmente dos vinhos tintos envelhecidos em barricas.

Estas leveduras podem reproduzir-se nos vinhos, utilizando concentrações residuais de açúcares e produzir grandes quantidades de ácido acético a partir da glucose (Chatonnet *et al.*, 1997).

Além de aumentarem a acidez volátil do vinho, as leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces* podem metabolizar os ácidos *p*-cumárico e ferrúlico (ácidos hidroxicinâmicos presentes no vinho), produzindo 4-etilfenol (4EF) e 4-etilguaicol, respectivamente, os quais conferem ao vinho um aroma normalmente descrito como "suor de cavalo", "animal" ou "couro". Apesar destes aromas terem normalmente uma conotação negativa, alguns produtores consideram que, a baixas concentrações, o "carácter Brett" pode contribuir positivamente para a complexidade do bouquet dos vinhos (Fugelsang, 1997).

A conversão do ácido *p*-cumárico em 4EF envolve a actividade de duas enzimas: a cinamato descarboxilase, que descarboxila o ácido fenólico directamente no vinilfenol correspondente, e a vinilfenol reductase que converte o vinilfenol em 4EF (Figura 1) (Chatonnet *et al.*, 1995).

Diversos factores ambientais foram testados para verificar o seu efeito no crescimento e na produção de 4EF pelas leveduras do género *Dekkera*, usando ácido *p*-cumárico como substrato. Este ácido foi escolhido por ser o ácido hidroxicinâmico mais abundante no vinho.

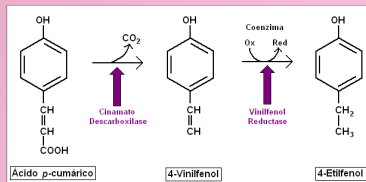


Figura 1 – Biossíntese de 4-Etilfenol a partir do ácido *p*-cumárico em leveduras do género *Dekkera*.

MATERIAL E MÉTODOS

Estirpes e condições de crescimento

Neste trabalho, foram usadas as estirpes de colecção *Dekkera anomala* PYCC 5153 e *Dekkera bruxellensis* PYCC 4801 (Colecção Nacional de Leveduras, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal). As culturas foram crescidas até final da fase exponencial em meio YMB (DIFCO, Detroit, EUA), com pH ajustado a 4,5 (excepto quando referido) e a 25°C. O crescimento celular foi monitorizado espectrofotometricamente (a 660 nm), e a concentração de 4EF determinada por GC-FID usando o método descrito por Bertrand (1981).

Rendimento da produção de 4-etilfenol a diferentes concentrações de ácido *p*-cumárico

As culturas foram crescidas em meio YMB contendo ácido *p*-cumárico a 0, 25, 50, 75 e 100 mg/L. A concentração de 4EF foi determinada ao fim de cinco dias de incubação.

Influência do pH e da concentração de SO₂ no crescimento e produção de 4EF

Para estudar o efeito do pH, as culturas foram crescidas em meio YMB suplementado com 25 mg/L de ácido *p*-cumárico e com pH ajustado a valores compreendidos entre 2,5 e 4,0. Para testar a influência do SO₂, as culturas foram crescidas em meio YMB suplementado com 50 mg/L de ácido *p*-cumárico, a pH 4,0 e com diferentes concentrações iniciais de SO₂ (ajustadas com soluções concentradas de bissulfito de sódio). O crescimento foi monitorizado diariamente e a concentração de 4EF foi determinada ao fim de cinco dias. A quantificação da concentração inicial de SO₂ molecular foi feita por titulação iodométrica e medição do pH do meio.

RESULTADOS

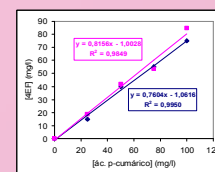


Figura 2 – Produção de 4-etilfenol (4EF) por *D. anomala* PYCC 5153 e *D. bruxellensis* PYCC 4801 em meio YMB (pH 4,5) suplementado com diferentes concentrações iniciais de ácido *p*-cumárico.

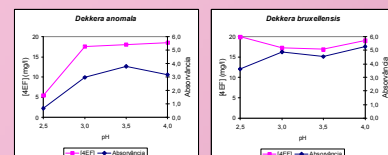
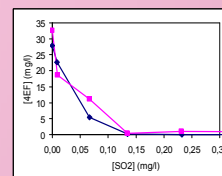


Figura 3 – Influência do pH na produção de 4-etilfenol (4EF) por *D. anomala* PYCC 5153 e *D. bruxellensis* PYCC 4801 em meio YMB suplementado com 25 mg/L de ácido *p*-cumárico; os valores de absorvância referem-se ao valor máximo atingido durante o crescimento.



<i>D. anomala</i>				<i>D. bruxellensis</i>			
[SO ₂] (mg/L)	Absorvância (máx.)	[4EF] (mg/L)	[SO ₂] (mg/L)	Absorvância (máx.)	[4EF] (mg/L)	[SO ₂] (mg/L)	Absorvância (máx.)
0	4,31	27,83	0	6,66	32,70		
0,01	1,58	22,72	0,01	1,64	18,77		
0,07	0,36	5,36	0,07	0,96	11,05		
0,14	0,08	0,29	0,14	0,06	0,46		
0,23	0,05	nd	0,23	0,06	0,82		
0,80	0,09	nd	0,72	0,06	0,55		
0,93	0,04	0,03	0,83	0,11	0,83		
1,21	0,10	nd	1,21	0,11	0,58		
1,47	0,04	nd	1,48	0,05	0,28		
3,15	0,09	nd	2,05	0,11	0,34		

Figura 4 – Produção de 4-etilfenol (4EF) por *D. anomala* PYCC 5153 e *D. bruxellensis* PYCC 4801 em meio YMB (pH 4,0) suplementado com 50 mg/L de ácido *p*-cumárico e diferentes concentrações iniciais de SO₂ molecular; os valores de absorvância apresentados referem-se aos valores máximos obtidos durante o crescimento. Legenda: nd – não detectado.

DISCUSSÃO

✦ Existe uma relação aparentemente linear entre a concentração inicial de ácido *p*-cumárico do meio de cultura e a concentração de 4EF produzida (Figura 2).

✦ Na gama de concentrações testada, a taxa de conversão de ácido *p*-cumárico em 4EF é de aproximadamente 76% no caso da *D. anomala* e 82% no caso da *D. bruxellensis* (Figura 2)

✦ Para valores de pH entre 3,0 e 4,0, não se verificaram diferenças significativas no crescimento e na concentração de 4EF produzida, para ambas as leveduras. A pH=2,5 houve inibição do crescimento e redução da concentração de 4EF produzido, no caso da *D. anomala* (Figura 3).

✦ A concentrações de SO₂ molecular superiores a 0,15 mg/L, o crescimento das duas leveduras e a produção de 4EF foram fortemente inibidos. No entanto, nas culturas de *D. bruxellensis* houve produção de 4EF mesmo a concentrações elevadas de SO₂ molecular (3,15 mg/L) (Figura 4).

REFERÊNCIAS

- Bertrand, A. (1981) *Colloque Société Française de Microbiologie*, pp. 251-267, Reims
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D. and Boidron, J. (1995) *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 46, 463-468
- Chatonnet, P., Viala, C. and Dubourdieu, D. (1997) *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 48, 443-448
- Fugelsang, K.C. (1997) *Wine Microbiology*, pp.73, London, Reino Unido, Ed. The Chapman & Hall Enology Library

AGRADECIMENTOS

F. M. Campos gostaria de agradecer à Fundação para a Ciência e a Tecnologia a bolsa de doutoramento PRAXIS XXI BD/19909/99.