

Avaliação qualitativa de produção de β -glucosidase por linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*

Odinéli Louzada dos Santos Corrêa^{1,3}, Bruna Carla Agustini³, Evandro Ficagna¹, Vitor Manfroi^{2*}

*Orientador

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS) - Campus Bento Gonçalves

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) - Embrapa Uva e Vinho

Introdução

A indústria enológica está constantemente buscando linhagens de leveduras que possibilitem um desenvolvimento ótimo no processo de fermentação. O isolamento de linhagens autóctones de *Saccharomyces cerevisiae* é uma opção muito favorável, pois agrega a eficiência do uso de linhagens selecionadas com a diversidade da microbiota autóctone (Belda, 2014).

A Coleção de Microrganismos de Interesse Agroindustrial (CMIA) é uma coleção de leveduras e fungos filamentosos abrigada pelo Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) da Embrapa Uva e Vinho, localizada em Bento Gonçalves- RS, e conta com mais de 4800 linhagens de leveduras de diferentes espécies. A maior parte da coleção, cerca de 90%, é oriunda de isolamentos de leveduras provenientes de uvas, de diferentes regiões brasileiras, constituindo um importante patrimônio da biodiversidade brasileira.

A composição aromática é um indicador utilizado para avaliar a qualidade do vinho e um fator importante que influencia a intenção de compra dos consumidores. O aroma complexo e equilibrado determina a aceitação dos vinhos comerciais no mercado. Já foram identificados mais de 1000 componentes de aroma, incluindo principalmente álcool, ésteres, ácidos orgânicos e terpenos em concentrações que variam de mg.L⁻¹ a ng.L⁻¹ (Bezus *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2021).

Atualmente, a liberação de aroma é aprimorada usando preparações enzimáticas de origem fúngica, principalmente *Aspergillus* spp. A composição dessas

preparações varia, mas geralmente são misturas de enzimas não específicas, o que pode desencadear reações colaterais de hidrólise prejudiciais ao produto além de diminuir a tipicidade do vinho (Bezus *et al.*, 2023; de Ovalle; Brena; González-Pombo, 2021).

Alguns compostos precursores de aromas são encontrados na forma não volátil, ligados à glicosídeos. Após uma sequência de hidrólises enzimáticas, tornam-se voláteis e, assim, perceptíveis sensorialmente. A β -glucosidase é uma enzima importante no processo de vinificação, pois contribui para a hidrólise de diferentes tipos de ligações glicosídicas, tais como ligações 1,4- β , promovendo a formação de terpenos livres, fenil propenos e ésteres alifáticos específicos durante a fermentação do vinho. Além disso, a β -glucosidase também modifica a composição dos compostos fenólicos, influenciando a concentração final de resveratrol e antocianinas no vinho (Rompkovski *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2021).

Os substratos arbutin e esculin são considerados os compostos análogos β -glicosídicos da uva mais confiáveis, por isso bastante usados nas pesquisas qualitativas in vitro de enzimas β -glucosidase (Perez *et al.*, 2011).

O trabalho tem como objetivo caracterizar as linhagens de leveduras autóctones da espécie *Saccharomyces cerevisiae* pela capacidade de produzir a enzima β -glucosidase, utilizando como substrato o arbutin.

Metodologia

Reativação de leveduras e preparo das suspensões de células

As leveduras foram retiradas do ultrafreezer (-80°C) e semeadas em placas ou tubos com meio YEPD e colocadas para crescimento em estufa a 28°C. Após crescimento satisfatório foram preparadas suspensões em água estéril com cerca de 10^7 células/mL. A concentração foi verificada através do uso do cartão de Wickerham. (LENETTE *et al.*, 1985).

Teste Qualitativo de Produção de β -glucosidase

A produção de enzima foi avaliada conforme a capacidade das leveduras em utilizar o substrato arbutin como fonte de carbono. Para o teste, foram alíquotados 25 mL do meio de cultura YNB $6,7\text{gL}^{-1}$ e colocados em erlenmeyer, adicionados de arbutin $0,75\text{g.L}^{-1}$, realizada a correção para pH 5,5 e esterilizados em autoclave a 121°C por 30 minutos. Após autoclavagem, 1mL de citrato férrico $0,1\text{g.L}^{-1}$ (previamente esterilizado) foi adicionado sob fluxo laminar. Em seguida, $200\mu\text{L}$ de suspensão das leveduras foram adicionados individualmente aos erlenmeyers. A leitura positiva/negativo foi realizada pela mudança de cor, após passados 7 dias em agitador-incubador a 150 rpm e 28°C . As amostras positivas passavam a apresentar coloração marrom.



Figura 1: Preparo do teste de produção de β -glucosidase

Resultados e Discussão

Foram selecionadas da Coleção CMIA 70 linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* que foram reativadas e testadas quanto à produção de β -glucosidase em bateladas de 20 amostras com um controle positivo em todas elas.



Figura 2: Leitura do resultado positivo para produção de β -glucosidase.

Número de linhagens	Nível de cor marrom
60	0
1	1
1	2
8	3

Tabela 1: Número de linhagens para cada nível de cor marrom

Foi observado variações de intensidade de cor marrom nos resultados das avaliações, por isso as amostras positivas foram separadas em 3 grupos, sendo o número 1 para as amostras mais claras e 3 para as amostras mais escuras.

Das 70 linhagens avaliadas, 10 apresentaram resultado positivo para a produção de β -glucosidase em algum nível, resultando em um percentual de 14,3 % de linhagens positivas. O resultado foi inferior ao encontrado por Gaensly (2015), que obteve 45,5 % de linhagens com resultado positivo para a produção de enzima. Porém foi bem superior ao encontrado por Rosi, Vinella e Domizio (1994) que foi de 0,65 % de linhagens *Saccharomyces cerevisiae* produtoras de β -glucosidase.

Considerações finais

O uso de leveduras autóctones produtoras de β -glucosidase pode trazer diversas vantagens ao setor vinícola nacional, podendo agregar tipicidade e qualidade aos produtos. O trabalho obteve como resultado a identificação de 10 linhagens autóctones de *Saccharomyces cerevisiae* produtoras da enzima β -glucosidase que podem potencialmente vir a ser utilizadas pela indústria na aprimoração de aromas dos vinhos brasileiros.

Palavras-chave: β -glucosidase, Aroma, Leveduras Autóctones

Referências

BELDA, I. *et al.* Microbiología del proceso de vinificación: selección de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas con óptimas propiedades enológicas. **Reduca (Biología)**. *Serie Microbiología*, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2014.

BEZUS, B. *et al.* Production and characterization of a novel cold-active β -glucosidase and its influence on aromatic precursors of Muscat wine. **Food Bioscience**, v. 53, 2023.

DE OVALLE, Stefani; BRENA, Beatriz; GONZÁLEZ-POMBO, Paula. Influence of beta glucosidases from native yeast on the aroma of Muscat and Tannat wines. **Food Chemistry**, v. 346, 2021.

FERNÁNDEZ, M.; ÚBEDA, J. F.; BRIONES, A. I. Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, n. 1-2, p. 29-36, 2000.

GAENSLY, F. *et al.* Autochthonous yeasts with β -glucosidase activity increase resveratrol concentration during the alcoholic fermentation of *Vitis labrusca* grape must. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 288–295, 2015.

LENETTE, E. *et al.* Manual of clinical microbiology, 4th ed. **American Society for Microbiology**, Washington, D.C. 1985.

PÉREZ, G., *et al.* A quick screening method to identify β -glucosidase activity in native wine yeast strains: Application of esculin glycerol agar (EGA) medium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 27(1), 47–55, 2011.

ROMPKOVKSI, Cintia *et al.* Microbial dynamics in industrial-scale wine fermentation employing *Hanseniaspora uvarum* β -glucosidase-producer strain. **Journal of Food Science and Technology**, v. 59, n. 4, p. 1570–1576, 2022.

ROSI, I.; VINELLA, M.; DOMIZIO, P. Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 77, p. 519-527, 1994.

ZHANG, P. *et al.* Beta-glucosidase activity of wine yeasts and its impacts on wine volatiles and phenolics: A mini-review. **Food Microbiology**, v. 100, 2021.