



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

CAMILA MUNIQUE PAULA BALTAR SILVA DE PONZZES

DIVERSIDADE E SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae* ISOLADAS DE UVAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE VINHOS NO VALE DO SÃO FRANCISCO, BRASIL

Feira de Santana, BA
2010

CAMILA MUNIQUE PAULA BALTAR SILVA DE PONZZES

DIVERSIDADE E SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae* ISOLADAS DE UVAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE VINHOS NO VALE DO SÃO FRANCISCO, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

Co-orientadores: Profa. Dra. Rita de Cássia Trindade

Pesquisador Dr. Giuliano Elias Pereira

Feira de Santana, BA
2010

AOS MEUS IRMÃOS

Half Yuri Nicholas Baltar Silva de Ponzzes

Jôse Noemia Baltar Silva de Ponzzes

AO MEU TIO

Paulo Henrique Carvalho Baltar de Oliveira

AO MEU AMOR

Cássio Ferreira Gomes

AOS MEUS PAIS

José Silva de Ponzzes e

Maria de Fátima Baltar Silva de Ponzzes

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado o dom da vida, a paciência de um anjo, ter colocado na minha vida pessoas especiais, e por ter Fé em tudo e em todos que vejo. Os seus ensinamentos me levam a acreditar que o caráter do homem não está na inteligência, mas sim no coração.

Aos meus pais, PONZZES (painho) e FÁTIMA (mainha), que sempre me apóiam e confiam no meu instinto de pássaro, nunca cortando as minhas asas, pois sabem que os meus vôos são para pousos em terras firmes e de sucesso. A vocês devo a minha vida, meus estudos, minhas conquistas e, sobretudo, o ser humano de bom coração que vocês me criaram. Sua chorona AMA e tem muito ORGULHO de vocês. Devo também a vocês os meus irmãos JÔSE, HALF e o meu tio PAULO HENRIQUE, que me amam mesmo eu sendo esta perfeccionista chatinha. AMO muito vocês. Vocês são o meu “Marco Zero”.

Ao meu noivo, CÁSSIO, que durante estes dois anos de mestrado me apoiou no momento em que eu mais precisei. Você me amou nas minhas ausências, que não foram poucas, e confortou-me quando me sentia só. Essa conquista não é apenas minha e sim de você também, quero voar cada vez mais, mas sempre ao seu lado. Os meus pais me deram as asas, mas você me deu o seu coração. Amo-te!!! Quero agradecer também a sua família (SEBASTIÃO, NATIVIDADE E JULIANA) por ser muito carinhosa comigo.

À COORDENAÇÃO e aos PROFESSORES do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana, que me encantaram pela dedicação em formar seus alunos em competentes profissionais e buscando sempre o melhor para os mesmos. A minha escolha se transformou em admiração.

Ao meu orientador, Prof. Dr. CARLOS AUGUSTO ROSA, que de olhos fechados me acolheu (muito bem) e teve que me agüentar, durante estes dois anos, com o meu lindo sotaque nordestino. Saiba que o amor que vi na sua forma de trabalhar, de ensinar e de cobrar é a forma que quero reproduzir, pode ser na forma de brotamentos, mas não como as leveduras fazem, e sim na transmissão de conhecimento. Sendo sua orientanda pude aprender e gostar muito mais do que escolhi para mim, e acredito que este é o verdadeiro poder que um bom orientador possua, por isso posso falar com orgulho que você é o meu orientador.

A minha co-orientadora, Prof^a Dr^a RITA DE CÁSSIA TRINDADE, pela inspiração que me foi dada no início da minha vida acadêmica. Nunca irei esquecer o dia em que me chamou de FUTURA MICROBIOLOGISTA na aula prática. Neste dia acreditei nas suas palavras e hoje vejo a força que tiveram. Obrigada por acreditar no meu potencial e abrir as portas do laboratório para mim. A sua pessoa devo todo o meu carinho pela microbiologia. Mais uma vez obrigada Rita, e saiba que essa Camilinha vai longe, graças ao ponta pé inicial que foi dado com a sua grande ajuda e confiança.

Ao meu co-orientador, Pesquisador Dr. Giuliano Elias Pereira, pela ENORME cooperação na minha pesquisa, na coleta das uvas, na produção dos vinhos, nos ensinamentos de enologia, tudo e mais um pouco devo a você. Acredito que sem o seu empenho em me ajudar e na vontade de ver e fazer com que cresça ainda mais a vitivinicultura no Vale do São Francisco, nada disso teria se concretizado com tanto amor. Lembro da sua emoção ao ver nos isolamentos as colônias de leveduras do Vale do São Francisco, neste momento consegui enxergar o quanto esta região é importante para você. Só tenho a agradecer e elogios a lhe dar. Devo também a outras pessoas importantes para o meu trabalho na EMBRAPA Semi-Árido (Petrolina/PE): ao microbiologista Dr. Gava, ao técnico Ernando, às antigas bolsistas Juliana, Sheila, e às atuais bolsistas Juliane, Ana Júlia e Lisieux.

À Fazenda Ouro Verde/Miolo (Casa Nova/BA) por ter cedido as uvas para o desenvolvimento deste mestrado.

A minha “mami” científica, Dângelly Lins M. F. de Mélo, a pessoa que mais me apoiou, segurou na minha mão e andou junto comigo em todos os momentos, literalmente, como uma mãe. Ainda vamos continuar andando de mãos dadas por muito tempo. Obrigada mami por sua paciência e PROTEÇÃO!!! Agradeço também ao meu “papi” científico, Antônio Márcio, a minha grande conselheira Patrícia Oliveira, e aos amigos do Laboratório de Microbiologia Aplicada da UFS, em especial minha grande AMIGA Carolzinha, Camila, Kamila, Patrícia Ferreira, Glads, Juliana e Bruninho.

Ao Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras (ICB-UFMG), em especial as pessoas que mais me ajudaram, apoiaram e ganharam a minha admiração Michelle, Polly, Raquel, Samantha, Fátima, Monaliza, Alessandra, Lindi, Elsiene, Mari, Lu, César e Mônica. Não sei o que seria sem vocês. Obrigada de coração.

Ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos (Faculdade de Farmácia/UFMG) pelo espaço cedido, em especial à Prof^a. Dr^a. Evellyn, Raquel e Ana.

Aos meus amigos do grupo dos excepcionais da UEFS, Aline (Excepcional Mor), Mona Liza, Matheus e Edivan. Nós nos divertimos muito durante esses dois anos de mestrado, o que eu mais ganhei nesse tempo foi a amizade que construí com vocês. Aline e Mona vocês foram mais que excepcionais para mim, foram as minhas verdadeiras amigas.

As minhas amigas, companheiras e família inter-estadual em Feira de Santana, Jéssica, Camila e Andrea, em Belo Horizonte, Ludimilla, e em Petrolina, Shirly e Maria Clara. Com vocês o meu mestrado foi um prêmio.

A Família de Anselmo, a família de Suymary e a família de Abel que me acolheram no início desta jornada. Só tenho a agradecer o grande respeito e solidariedade.

Por fim, agradeço a todos que acompanharam o meu crescimento científico e fizeram com que, direta ou indiretamente, eu concluísse mais esta etapa da minha vida!!!

*“De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...
Por tanto, devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro”.*

(Fernando Pessoa)

RESUMO GERAL

Os vinhos produzidos no Vale do São Francisco estão ganhando espaço no mercado brasileiro e internacional. No entanto, esta região ainda não possui vinhos típicos produzidos com leveduras indígenas. O objetivo deste trabalho foi selecionar linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas do mosto fermentado de uvas *Vitis vinifera* L. cultivadas no Vale do São Francisco para serem utilizadas como iniciadoras do processo fermentativo para a elaboração de vinhos. Do mosto naturalmente fermentado foram isolados e identificados 155 *S. cerevisiae* e 60 leveduras não-*Saccharomyces*. As espécies de leveduras não-*Saccharomyces* pertenciam aos gêneros *Pichia*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Wickerhamomyces* e *Kloeckera*. A identificação das leveduras não-*Saccharomyces*, exceto *K. apis*, foi pelo sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA. Dentre os 155 isolados de *S. cerevisiae*, quatro perfis moleculares de linhagens indígenas foram encontrados por meio da técnica de restrição do DNA mitocondrial. As linhagens indígenas e uma comercial foram testadas em meio sintético para selecionar as melhores fermentadoras. Duas linhagens foram selecionadas (68 e 152), e juntamente com a linhagem comercial utilizada na região, foram utilizadas para produzir vinhos em pequena escala usando uvas da cultivar Cabernet Sauvignon. As análises físico-químicas dos vinhos produzidos pelas três linhagens foram similares. Por meio da técnica de restrição do DNA mitocondrial foi possível observar que a linhagem 152 predominou ao final da fermentação alcoólica e fermentação malolática, o mesmo não ocorrendo com a linhagem 68. Os resultados sugerem que a linhagem 152 poderia ser utilizada na produção de vinhos no Vale do São Francisco.

Palavras-chave: Vinhos tropicais. Vale do São Francisco. *Saccharomyces cerevisiae*. Não-*Saccharomyces*. Domínio D1/D2 do rRNA. RFLP-mtDNA. (GTG)₅.

ABSTRACT

Wine which is being produced at São Francisco Valley is conquering both Brazilian and International markets. However, this region does not have a typical wine produced with indigenous yeasts. The aim of this study was to select strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from the fermented must of the *Vitis vinifera* L. grapes grown at São Francisco Valley in order to use them as starter culture of the fermentative process for wine preparation. From the must naturally fermented 155 *S. cerevisiae* and 60 non-*Saccharomyces* yeasts were isolated and identified. The non-*Saccharomyces* yeast species belonged to the genera *Pichia*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Wickerhamomyces* and *Kloeckera*. The identification of the non-*Saccharomyces* yeasts, except for *K. apis*, was done by the sequencing of the D1/D2 domains of the large subunit of the rRNA gene. Amongst the 155 *S. cerevisiae* isolates, four molecular profiles of indigenous strains were found by using the mitochondrial DNA restriction technique. The indigenous strains and a commercial starter culture were tested in synthetic medium in order to select the strains with better fermentation performance. Two strain were selected (68 and 152), and together with the commercial strain were utilized to make wine in small scale using the grape cultivar Cabernet Sauvignon. The physico-chemical analyses of the wine produced by the three strains were similar. By using the mitochondrial DNA restriction technique it was possible to observe that the strain 152 was predominant at the end of the alcohol and malolactic fermentations, whereas the strain 68 did not dominate the fermentation. The results suggest that the strain 152 could be used to produce wine at São Francisco Valley.

Key words: Tropical wines. São Francisco Valley. *Saccharomyces cerevisiae*. Non-*Saccharomyces*. D1/D2 domains of the rRNA. RFLP-mtDNA. (GTG)₅.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	2
2 OBJETIVOS	4
2.1 GERAL	4
2.2 ESPECÍFICOS	4
3 REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1 UVAS DO VALE DO SÃO FRANCISCO	6
3.2 UVAS VINÍFERAS	6
3.3 VINHO	7
3.4 LEVEDURAS COMO AGENTES DE FERMENTAÇÃO	8
3.5 IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS	10
4 METODOLOGIA	13
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO ESTUDADA	13
4.2 METODOLOGIA DE ESTUDO	13
CAPÍTULO 1	15
ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS A PARTIR DE POLPA FERMENTADA DE CULTIVARES DE UVA (<i>Vitis vinifera</i> L.) DO VALE DO SÃO FRANCISCO, BAHIA, BRASIL	15
RESUMO	17
1 INTRODUÇÃO	18
2 MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.1 AMOSTRAGEM	20
2.2 FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA E ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS	20
2.3 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS	21
2.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS NÃO- <i>Saccharomyces</i>	21
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
3.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS	25
3.1.1 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DAS <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
3.1.2 CARACTERIZAÇÃO MORFO-FISIOLÓGICAS E MOLECULAR DAS LEVEDURAS NÃO- <i>Saccharomyces</i>	27
3.1.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS NÃO- <i>Saccharomyces</i>	30
AGRADECIMENTOS	34
REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO 2	40
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LINHAGENS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ISOLADAS A PARTIR DE CULTIVARES DE UVA (<i>Vitis vinifera</i> L.) UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DOS VINHOS DO VALE DO SÃO FRANCISCO, BRASIL	40
RESUMO	42
1 INTRODUÇÃO	43
2 MATERIAIS E MÉTODOS	45
2.1 MICRORGANISMOS	45
2.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	45

2.2.1	OBTENÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL	45
2.2.2	RFLP-mtDNA	46
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	47
	AGRADECIMENTOS	52
	REFERÊNCIAS	52

CAPÍTULO 3	57
-------------------	-----------

	PRODUÇÃO DE VINHOS UTILIZANDO LINHAGENS SELECIONADAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ISOLADAS NA REGIÃO DO VALE DO SÃO FRANCISCO, BAHIA, BRASIL	57
	RESUMO	59
1	INTRODUÇÃO	60
2	MATERIAL E MÉTODOS	63
2.1	LINHAGENS DE LEVEDURAS	63
2.2	PARÂMETROS CINÉTICOS FERMENTATIVOS	64
2.2.1	PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	64
2.2.2	EXPERIMENTOS DE FERMENTAÇÃO	64
2.2.3	CÁLCULOS DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO	66
2.3	PRODUÇÃO DE VINHOS	66
2.4	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS VINHOS	67
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
2.6	AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DAS LINHAGENS SELVAGENS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AO FINAL DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA E FERMENTAÇÃO MALOLÁTICA	68
2.6.1	ISOLAMENTO DAS LINHAGENS NOS VINHOS	68
2.6.2	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PELA RESTRIÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL (RFLP-mtDNA)	68
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
3.1	ANÁLISE DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA FERMENTAÇÃO	70
3.2	ANÁLISES DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS VINHOS	74
3.3	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	77
	AGRADECIMENTOS	82
	REFERÊNCIAS	82

5 CONCLUSÕES GERAIS	89
----------------------------	-----------

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
-----------------------------------	-----------

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da uva (*Vitis vinifera*) para vinho no semi-árido, na região do Vale do São Francisco, está se ampliando muito rapidamente e a produção do vinho já abrange um mercado consumidor interno fixo, além de ser exportado para países que são grandes consumidores de vinhos. Atualmente, os vinhos do Vale do São Francisco são produzidos com leveduras estrangeiras, isso acaba aumentando o custo do produto final além de não conferir aos vinhos produzidos uma característica típica da região. Como consequência, existe um grande interesse das fazendas vitiviníferas em produzir os vinhos com leveduras típicas da região. A utilização de linhagens típicas de *S. cerevisiae* isoladas de polpas de uva da região pode conferir características próprias aos vinhos, agregando valor ao produto final.

Para se caracterizar corretamente as linhagens de *S. cerevisiae* é necessário uma investigação molecular por meio da qual se poderá complementar os conhecimentos ecológicos e fisiológicos acerca dos isolados encontrados. A análise de restrição do DNA mitocondrial permite diferenciar e selecionar as linhagens predominantes no ecossistema vinícola. O sequenciamento das regiões D1/D2 da subunidade 26S do gene do rRNA e das regiões do espaçador transcrito interno (ITS), são ferramentas moleculares fundamentais para a correta caracterização taxonômica de uma espécie de levedura. O sequenciamento destas regiões do gene do rRNA é suficiente para a delimitação das espécies, e, além disto, no presente estudo, será útil para reconhecer possíveis espécies novas associadas ao ecossistema vinícola.

A seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, da própria uva (*Vitis vinifera*) do Vale do São Francisco, poderá trazer grandes vantagens, como a redução dos custos de produção e bebidas com características típicas da região. Os vinhos do Vale do São Francisco são produzidos na sua grande maioria com leveduras australianas e/ou outras estrangeiras que oneram significativamente o processo. Desse modo, a vinícola que utilizar *S. cerevisiae* isoladas das uvas do Vale do São Francisco em seus processos de produção de vinho, terá grandes possibilidades de destaque no mercado uma vez que serão oferecidos vinhos com características típicas regionais. Nesse sentido, é de extrema importância estudar a biodiversidade de leveduras existente nas culturas de uva para vinho da região e, principalmente, selecionar linhagens regionais de *S. cerevisiae*.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Selecionar linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de uvas *Vitis vinifera* L. cultivadas no Vale do São Francisco para serem utilizadas como iniciadoras do processo fermentativo para a elaboração de vinhos da região.

2.2 ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar as leveduras isoladas a partir de mosto fermentado de uva (*V. vinifera* L.) (CAPÍTULO 1);

- Caracterizar molecularmente as linhagens de *S. cerevisiae* isoladas a partir de cultivares de uva (*V. vinifera* L.), utilizadas na produção dos vinhos do Vale do São Francisco (CAPÍTULO 2) e

- Produzir vinhos em escala piloto utilizando uvas da cultivar Cabernet Sauvignon com linhagens de *S. cerevisiae* isoladas e selecionadas na região do Vale do São Francisco, analisando as características físico-químicas dos vinhos, além de avaliar a presença destas linhagens selecionadas ao final da fermentação alcoólica e malolática (CAPÍTULO 3).

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 UVAS DO VALE DO SÃO FRANCISCO

A cultura da uva (*Vitis vinifera* L.) utilizada nos processos de produção dos vinhos do nordeste brasileiro, denominado submédio do São Francisco, vem se desenvolvendo rapidamente por vários motivos, dentre eles, grandes investimentos, irrigação (disponibilidade de água do Rio São Francisco), e o surgimento de fazendas experimentais associadas à Embrapa Semi-árido. Com isso é possível um crescente aumento do número de empregos na região, além de conferir a esta o título de 2º maior pólo vinícola do país (HANNA INSTRUMENTS, 2007).

As uvas desta região são cultivadas entre os paralelos 8º e 9º de latitude Sul, as mais baixas latitudes na viticultura mundial, com altitude média de 400 metros e em áreas planas, na caatinga do sertão nordestino (SANTOS, 2008). Esta região fica próxima às cidades de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA), sendo os vinhedos distribuídos entre os estados da Bahia e Pernambuco, às margens do rio São Francisco. Esta localidade possui peculiaridades como: estar presente no único semi-árido tropical do mundo, possibilidade de produzir safra em qualquer época do ano, oferta de mão-de-obra e uma baixa incidência de doenças. Ademais, possui uma área irrigada por sistema de gotejamento com as próprias águas do Rio São Francisco. A região possui 120.000 ha, uma área irrigável de 360.000 ha, uma insolação de 3.000 h/ano, com uma temperatura média de 26°C e uma pluviosidade irregularmente distribuída em média de 450 mm/ano (concentrando-se nos meses de novembro a abril) (VALE BUSINESS, 1999).

3.2 UVAS VINÍFERAS

Atualmente existe, aproximadamente, de 60 a 70 tipos de uvas (*Vitis vinifera* L.) utilizadas na produção dos principais vinhos no mundo. Por meio da seleção natural de uvas, ao longo dos séculos, nos países de tradição vinícola (França, Itália, Espanha e Portugal) foram prevalecendo as melhores cultivares, aquelas que se adaptavam ao ambiente com frutos de melhor qualidade. Com isto, estas uvas foram exportadas para outros países, mas suas características nem sempre foram mantidas quando comparadas as de seu local de origem (SANTOS, 2008). Algumas destas uvas foram transportadas para o Brasil, assim como para o Vale do São Francisco, no semi-árido brasileiro, e estão descritas a seguir, conforme Jackson (2008) e Santos (2008):

- *Cabernet Sauvignon*: considerada a “rainha dos vinhos tintos”, é a cultivar tinta mais conhecida, possui bagas pequenas, ácidas, com muitas sementes, cor carregada e casca grossa, com muito tanino, no qual origina vinhos naturalmente tânicos, com potencial para longa vida. É

cultivada desde o século XVII na França (Bordeaux), possui características marcantes, lembrando pimentão verde, azeitona preta, groselha e pimenta-do-reino preta. Análises com a técnica de impressão digital do DNA indicam que esta cultivar é resultado do cruzamento da Cabernet Franc com Sauvignon Blanc (BOWERS & MEREDITH, 1997);

- *Grenache*: é uma das variedades de uva mais plantadas no mundo, seus cachos são grandes e compactos, variando de rosa a vermelho dependendo da quantidade da safra. Esta cultivar tinta possui pouco tanino e aromas típicos de pimenta-do-reino, erva e óleo de linhaça. Esta uva é muito bem adaptada ao calor, condições secas e tende a ser excessivamente produtiva com irrigação;

- *Tempranillo*: variedade cujo nome em espanhol significa que amadurece mais cedo que a maioria das variedades tintas, cultivada amplamente na Espanha onde é considerada, provavelmente, a mais fina das variedades tintas. É uma variedade com a casca grossa e tamanho médio, que produz vinhos com aroma de framboesa e com características tânicas;

- *Sauvignon blanc*: é uma das primeiras variedades brancas em *Bordeaux*, e a principal cultivar no alto do Vale do Loire. Variedade de coloração amarelo-pálido, acidez natural possuindo um grande leque aromático (abacaxi, maracujá, *toranja-grapefruit*, manga, pólvora, grama recém-cortada).

3.3 VINHO

O vinho é uma bebida alcoólica fermentada, que é obtido genericamente pela fermentação alcoólica de um suco de fruta natural madura (mosto), por ação de leveduras que convertem o açúcar em álcool etílico e gás carbônico. A bebida fermentada recebe somente o nome de vinho quando for proveniente apenas da uva. Para bebidas produzidas por fermentação alcoólica que não seja a uva deve-se indicar o nome da fruta. Utilizando qualquer fruta que contenha níveis razoáveis de açúcar é possível se produzir um bom vinho, com os sabores característicos da mesma (CORAZZA, 2001). Sendo assim, qualquer fruto ou vegetal que contenha umidade, açúcar e nutrientes para as leveduras, pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de bebidas alcoólicas fermentadas (MARTINELLI FILHO, 1983).

A fermentação alcoólica é uma reação exotérmica, podendo atingir 45°C ou mais, e assim levar morte da levedura sem concluir a fermentação. Os açúcares presentes na uva são glicose e frutose, sendo o primeiro mais utilizado na fermentação. Quando há açúcar residual este é quase todo constituído de frutose. Os açúcares das uvas são os responsáveis pelo teor de álcool do vinho, assim, teoricamente, para obter 1 grau alcoólico (%vol.) na fermentação, são necessários cerca de 17,5 g/L de açúcar na uva, mas se a uva não possuir o teor necessário de açúcar, no início da fermentação, pode-se adicionar sacarose. Esta prática é denominada na vinificação de

chaptalização. No processo de vinificação, além do álcool etílico e do gás carbônico, formam-se outras substâncias, em menor volume, que influenciam as características organolépticas do vinho. Contudo a quantidade e a qualidade dessas substâncias dependem do tipo de uva, da levedura e das condições de fermentação (SANTOS, 2008). Segundo Santos (2008), quase quinhentas substâncias químicas naturais podem ser identificadas no vinho.

De acordo com Madigan et al. (1997), existem dois tipos de leveduras envolvidas na produção de vinho, as chamadas leveduras selvagens e as leveduras cultivadas. As primeiras são as leveduras que estão presentes na própria fruta e transferidas para o suco; as segundas são aquelas adicionadas ao suco para realizar a fermentação, como exemplo, as linhagens selecionadas de *S. cerevisiae*.

3.4 LEVEDURAS COMO AGENTES DE FERMENTAÇÃO

Segundo Kurtzman, Fell (1998), leveduras são microrganismos tradicionalmente envolvidos em processos fermentativos que trazem como consequência a modificação, o melhoramento ou a deterioração dos alimentos açucarados. Estão presentes em microhabitats como frutas, flores, casca de árvores, além de poder viver simbioticamente com animais, especialmente insetos. Ademais, poucas espécies são patogênicas para animais e humanos.

Historicamente, existem registros do uso de leveduras desde a antiguidade, como na produção de cerveja em 7000 anos a.C. na Suméria, na produção de vinho na Assíria em 3500 anos a.C e entre os romanos que tinha mais de 250 padarias produtoras de fermento em 100 anos a.C. Os principais produtos produzidos pelas fermentações das leveduras, em termos de toneladas/ano em todo o mundo são: cerveja (60 milhões de toneladas), vinho (30 milhões de toneladas), proteína e forragem (800 mil toneladas), leveduras para panificação (600 mil toneladas) e a produção do ácido cítrico (500 mil toneladas) (KURTZMAN; FELL, 1998).

Vários fatores interferem para a qualidade das bebidas alcoólicas fermentadas, como a matéria-prima, a fermentação, o envelhecimento, entre outros. Contudo, as leveduras e as condições de fermentação têm sido apontadas como os fatores que mais influenciam nas características finais dessas bebidas, pois é durante a fermentação que a maioria dos compostos responsáveis pelo sabor é formada (LEHTONEN; JOUNELA-ERIKSSON, 1983).

A produção destes compostos varia com as espécies e as linhagens de leveduras, assim, a contribuição destes microrganismos para a individualidade dos sabores depende do papel ecológico dos mesmos na fermentação e dos muitos fatores que determinam esta ecologia (FLEET; HEARD, 1993; FLEET, 2001). O metabolismo das leveduras influencia a composição final das bebidas, sendo diferente para cada linhagem (CLEMENTE-JIMENEZ et al., 2005; OLIVEIRA et al. 2005; QUEROL; FLEET, 2006; GOMES, 2006). A ocorrência e o crescimento das leveduras durante a

fermentação alcoólica podem ser afetados pela população inicial, pela utilização de culturas iniciadoras, pela composição química do mosto, incluindo resíduos de fungicidas/pesticidas, pela temperatura da fermentação, bem como pelas interações entre as diferentes espécies e linhagens de microrganismos (FLEET; HEARD, 1993; BISSON, 1999; FLEET, 2001; GOMES, 2006).

Durante a produção de vinho, leveduras, bactérias e fungos filamentosos contribuem para determinar a ecologia microbiana do processo e para a composição química da bebida (FLEET, 1993; FUGELSANG, 1997). Em ecossistemas complexos, com diferentes espécies e linhagens, existe a possibilidade de ocorrer interações entre os microrganismos. A diversidade dessas interações, com bases bioquímicas, fisiológicas e moleculares ainda pouco entendidas, esta relacionada à eficiência do processo e qualidade do produto, assim, precisa ser identificada e avaliada (FLEET, 2003). Além de interações, contribuem para a diversidade dos microrganismos, as sucessivas adaptações evolutivas que estes têm sofrido ao longo do tempo (QUEROL et al., 2003). Estudos realizados durante a produção de vinho mostraram que as leveduras não-*Saccharomyces* têm origem na casca da uva e equipamentos vinícolas (FLEET; HEARD, 1992). Entretanto, a origem da espécie *S. cerevisiae* é uma questão polêmica. Estudos afirmam que esta espécie é praticamente ausente nas uvas e solo de videiras (MARTINI; VAUGHAN-MARTINI, 1990), outros propõem que é um organismo “natural” em frutas (MORTIMER; POLSINELLI, 1999; SNIEGOWSKI; DOMBROWSKI; FINGERMAN, 2002). Alguns trabalhos têm mostrado que as linhagens de *S. cerevisiae* podem ser isoladas de uvas colocadas para fermentar, pois o processo de fermentação, por meio do papel seletivo do etanol formado, seleciona as linhagens de *S. cerevisiae* (POLSINELLI et al., 1996; SCHULLER et al., 2005; VALERO et al., 2007). Ainda, autores sugerem que *S. cerevisiae* é uma espécie domesticada, que tem origem no seu parente mais próximo, *S. paradoxus*, uma espécie selvagem encontrada em todo o mundo associada a insetos, exudatos de árvores e extrato fermentado de plantas (NAUMOV, 1996). Ciani e colaboradores, em 2004, investigaram a origem das linhagens de *S. cerevisiae* envolvidas na produção de vinho e concluíram que aquelas encontradas no ambiente da vinícola, incluindo as uvas, são as responsáveis pela fermentação espontânea do mosto de uva. Estas são transferidas deste nicho ecológico para os fermentadores (ROSINI, 1984).

O uso de linhagens selecionadas favorece o início mais rápido do processo e os riscos de contaminação apresentados pela fermentação espontânea podem ser evitados, favorecendo menor competição por nutrientes essenciais, maior rendimento e qualidade do produto resultante (FLEET; LAFON-LAFOURCADE; RIBÉREAU-GAYON, 1984; SANNI; LONNER, 1993). As culturas iniciadoras conseguem dominar o processo porque são adicionadas em altas concentrações, prevalecendo sobre a microbiota indígena. No entanto, estudos mostram que a microbiota transiente tem uma participação importante no processo (BARROS LOPES et al., 1996). Segundo Longo e

colaboradores (1992), estas linhagens indígenas mostram maior adaptação ao meio e às condições particulares de fermentação, além de aromas e sabores típicos da região.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

As leveduras são tradicionalmente identificadas usando características morfológicas e fisiológicas. Para a identificação específica, estudos bioquímicos e de exigências nutricionais são mais relevantes que traços morfológicos e sexuais, os quais são importantes na determinação genérica. Diferenças na fermentação e assimilação de compostos de carbono são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras, pois estes microrganismos apresentam uma variação na habilidade de fermentação de açúcares (KURTZMAN; FELL, 1998). O uso de técnicas de biologia molecular tem sido proposto para complementar as limitações dos sistemas apresentados, uma vez que a caracterização de linhagens atípicas, incluindo novas espécies que não podem ser identificadas com segurança pelos procedimentos convencionais, requerem a aplicação de técnicas como sequenciamento do gene do rRNA (KURTZMAN; FELL, 2006).

Diferentes estratégias baseadas na análise do polimorfismo de DNA têm sido utilizadas para diferenciar linhagens de *S. cerevisiae* envolvidas em fermentação alcoólica (QUEROL; RAMÓN, 1996). Estas são ferramentas poderosas, não somente para o controle industrial e tecnológico, mas também para a pesquisa ecológica dentro da diversidade intraespecífica da microbiota indígena (VERSAVAUD et al., 1995; PATARO et al., 2000; GUERRA et al., 2001).

Desde que os métodos de cariotipagem por bandas eletroforéticas e as análises do DNA mitocondrial foram definidos, estudos mostram que diferentes linhagens de *S. cerevisiae* estão envolvidas simultânea ou sucessivamente na fermentação espontânea do vinho, e ainda, que as linhagens variam com a região geográfica, condições climáticas, época do ano e substratos. A ampla distribuição de algumas linhagens em determinadas regiões vinícolas e a permanência destas ao longo de dois anos, sugere a ocorrência de linhagens indígenas específicas, representantes de uma região, e que há relação entre origem geográfica e relações genéticas entre as linhagens (VEZINHET et al., 1992; SABATE et al., 1998; ESTEVE-ZARZOSO et al., 2000). A existência de linhagens específicas de *S. cerevisiae* em diferentes regiões vinícolas representa uma adaptação das mesmas a microambientes específicos. Alguns enólogos admitem que bons resultados possam ser obtidos usando linhagens originadas destes microambientes como iniciadoras em processos fermentativos (ESTEVE-ZARZOSO et al., 2000).

Um marcador molecular amplamente utilizado na identificação e diferenciação de espécies é o gene do RNA ribossomal (rRNA). O gene do rRNA nos eucariotos está presente repetidas vezes e

cada unidade consiste de regiões codificadas para os genes rRNA 18S, 5.8S e 26S, e dois espaçadores transcritos internos – *Internal Transcribed Spacers* (ITS 1 e ITS 2) que separam essas regiões. Cada unidade do rRNA é separada por um espaçador intergênico – *Inter Genetic Spacers* (IGS). A unidade do gene do rRNA apresenta componentes em sua sequência que envolve variações e podem ser usadas em estudos de sistemática para diferentes níveis taxonômicos (KURTZMAN; FELL, 2006). A diferenciação intraespecífica de linhagens de *S. cerevisiae*, por exemplo, pode ser feita por meio da análise de restrição do DNA mitocondrial, sendo uma técnica aceita para diferenciar linhagens de *S. cerevisiae* (FREZIER; DUBOURDIEU, 1992; ESTEVEZARZOSO et al., 2000; FERNÁNDEZ-ESPINAR et al., 2001; SCHULLER et al, 2005; GOMES et al., 2007).

METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO ESTUDADA

A área de estudo foi a Fazenda Ouro Verde/Miolo que está localizada no semi-árido nordestino, no município de Casa Nova, Bahia. Esta fazenda possui uma área de 700 ha no Vale do São Francisco, com 200 ha de vinhedo, mas com previsão de implantação de 400 ha até 2012. As uvas (*V. vinifera* L.) cultivadas na fazenda são tintas (Shiraz, Cabernet Sauvignon, Grenache e Tempranillo) e brancas (Chenin blanc, Verdejo, Sauvignon blanc e Moscatel).

O semi-árido nordestino apresenta características edafoclimáticas peculiares. No domínio da caatinga, as populações co-existem com as mais adversas dificuldades naturais, adaptando-se às imposições do clima. De acordo com o Ministério da Integração Nacional (2005), todos os estados do nordeste, com exceção do Maranhão, e norte de Minas Gerais pertencem ao semi-árido brasileiro, totalizando 1.133 municípios em 969.589,4 km². As características das regiões integrantes do semi-árido brasileiro são as seguintes: risco de seca, precipitação pluviométrica média anual inferior a 800 milímetros, índice de aridez de até 0,5 calculado pelo balanço hídrico que relaciona as precipitações e a evapotranspiração potencial, no período entre 1961 e 1990.

4.2 METODOLOGIA DE ESTUDO

O desenvolvimento deste trabalho consistiu na realização de atividades de campo, atividades laboratoriais e análise integrada dos dados, com caráter exploratório complementado pela pesquisa descritiva – a qual consiste na descrição das características de uma população ou fenômeno ou o estabelecimento de relações entre variáveis (GIL, 1996) – tendo como metodologia empregada à abordagem qualitativo-quantitativa. A abordagem qualitativa foi realizada por meio de um levantamento bibliográfico acerca da importância da viticultura para a região do vale do São Francisco (Petrolina/PE e Juazeiro/BA), bem como a sua utilização na produção dos vinhos do Vale. Ademais, conhecer as populações de leveduras presentes nas uvas da referida região permitirá diversos estudos futuros. Outra abordagem qualitativa foi verificada na seleção dos isolados de *S. cerevisiae* para serem submetidos a ensaios de produção de vinho. Em relação à análise quantitativa, esta se consistiu no estudo dos dados encontrados de acordo com as características físicas, químicas e sensoriais dos vinhos e nas avaliações microbiológicas (isolamento e caracterização das linhagens de leveduras fermentadoras).

Essa dissertação está desenvolvida na forma de capítulos, iniciando com uma breve introdução acerca do problema pesquisado, seguida por uma revisão bibliográfica a partir da qual foram

delimitados objetivos. De cada objeto específico será gerado um artigo, elaborado conforme as normas da revista o qual será submetido e aqui denominado capítulo. A partir dos resultados obtidos nos três capítulos foi realizada uma conclusão geral.

CAPÍTULO 1

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS A PARTIR DE POLPA
FERMENTADA DE CULTIVARES DE UVA (*Vitis vinifera* L.) DO VALE DO SÃO
FRANCISCO, BAHIA, BRASIL**

FOOD MICROBIOLOGY

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS A PARTIR DE POLPA FERMENTADA DE CULTIVARES DE UVA (*Vitis vinifera* L.) DO VALE DO SÃO FRANCISCO, BAHIA

CAMILA M. P. B. S. DE PONZZES ^a *, DÂNGELLY L. F. M. DE MÉLO ^a, CAROLINE A. SANTANA ^a, GIULIANO E. PEREIRA ^b, RITA C. TRINDADE ^a, CARLOS A. ROSA ^c

^a Laboratório de Microbiologia Aplicada, Departamento de Morfologia - Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon, s/n, Jd Rosa Else. CEP: 49.100-000 - São Cristóvão, SE - Brasil

^b Pesquisador Embrapa Uva e Vinho/Semi-Árido BR 428, Km 152, Zona Rural - Caixa Postal 23 - CEP 56302-970 - Petrolina, PE - Brasil

^c Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras / Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha - C.P. 486 - CEP 31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil

* Corresponding author

Tel.: 55 079 21056628

E-mail address: camiladeponzzes@hotmail.com

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi identificar leveduras isoladas a partir de polpa fermentada de uva (*Vitis vinifera* L.) utilizadas para a produção de vinhos no Vale do São Francisco, Brasil, por meio do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA. Das uvas foram isolados 155 *S. cerevisiae* e 60 leveduras não-*Saccharomyces*. *Pichia kudriavzevii*, *P. guilliermondii*, *P. galeiformis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. zemplinina*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Kloeckera apis* foram as espécies não-*Saccharomyces* encontradas. Os mostos fermentados das uvas mostraram-se um ambiente favorável para o isolamento destas espécies e os fatores seletivos encontrados neste microambiente, como a concentração de álcool, a concentração de açúcar e temperatura, entre outros fatores, contribuíram para que houvesse a delimitação destas populações de leveduras.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, não-*Saccharomyces*, (GTG)₅, sequenciamento, Vale do São Francisco, *Vitis vinifera* L.

1 INTRODUÇÃO

Leveduras são microrganismos tradicionalmente envolvidos em processos fermentativos que trazem como consequência a modificação, o melhoramento ou a deterioração dos alimentos açucarados. Estes microrganismos estão presentes em microhabitats como frutas, flores, casca de árvores, além de poder viver simbioticamente com animais, especialmente insetos (Kurtzman & Fell, 1998).

O suco da uva fresca esmagada abriga uma diversidade de espécies de leveduras, principalmente dos gêneros *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), *Pichia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Issatchenkia*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Torulaspota*, *Dekkera* e *Schizosaccharomyces*. Estas são logo ultrapassadas nas contagens populacionais por *Saccharomyces cerevisiae* que domina do meio à fase final do processo, à medida que a concentração de álcool aumenta (Fleet & Heard, 1993; De La Torre et al., 1999; Mills et al., 2002; Fleet, 2003; González et al., 2007; Fugelsang & Edwards, 2007; Fleet, 2008; Urso et al., 2008; Barrajon et al., 2009; Chavan et al., 2009).

Saccharomyces cerevisiae é a espécie de levedura mais utilizada na produção de vinhos como iniciadora das fermentações. Cada vez mais os produtores de vinho buscam dar tipicidade às suas bebidas, sendo que isto é possível quando se utilizam leveduras indígenas nos processos de fermentação. Alguns trabalhos têm mostrado que os isolados de *S. cerevisiae* podem ser obtidos a partir de uvas em fermentação, já que o álcool formado exerce papel seletivo para manutenção das linhagens de *S. cerevisiae* no ambiente fermentativo (Polsinelli et al., 1996; Esteve-Zarzoso et al., 2000; Jemec et al., 2001; Sniegowski et al., 2002; Demuyter et al., 2004; Cappello et al., 2004; Clemente-Jimenez et al., 2004; Schuller et al., 2005; Valero et al., 2007; Lopandic et al., 2008).

Vários fatores interferem com a qualidade das bebidas alcoólicas fermentadas, como a matéria-prima, a fermentação, o envelhecimento, entre outros. Contudo, as leveduras e as condições

de fermentação têm sido apontadas como os fatores que mais influenciam na característica final dessas bebidas, pois é durante a fermentação que a maioria dos compostos responsáveis pelo sabor é formada (Lehtonen & Jounela-Eriksson, 1983). A produção destes compostos varia com as espécies e as linhagens de leveduras. Assim, a contribuição destes microrganismos para a individualidade dos sabores depende do papel ecológico dos mesmos na fermentação e dos muitos fatores que determinam esta ecologia (Fleet & Heard, 1993; Pretorius, 2000; Fleet, 2001; Oliveira et al. 2005; Clemente-Jimenez et al., 2005; Querol & Fleet, 2006; Gomes, 2006).

Diferentes estratégias baseadas na análise do polimorfismo de DNA têm sido utilizadas para diferenciar linhagens de *S. cerevisiae* envolvidas em fermentação alcoólica, entre elas a restrição do DNA mitocondrial (Frezier & Dubourdiou, 1992; Querol & Ramón, 1996; Esteve-Zarzoso et al., 2000; Fernández-Espinar et al., 2001; Schuller et al, 2005; Gomes et al., 2007). Estas estratégias moleculares apresentam-se como ferramentas poderosas, não somente para o controle industrial e tecnológico, mas também para a pesquisa da diversidade intraespecífica da microbiota indígena (Versavaud et al., 1995; Pataro et al., 2000; Guerra et al., 2001). O uso de técnicas de biologia molecular tem sido proposto para complementar as limitações da identificação feita com auxílio de testes fisiológicos, uma vez que a caracterização de linhagens atípicas requer a aplicação de técnicas como sequenciamento do gene do rRNA (Kurtzman & Fell, 2006). Estudos visando chegar a uma correta caracterização taxonômica de uma espécie de levedura estão sendo feitos com a realização do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA (Kurtzman & Robnett, 1998; Cocolin et al., 2000; Fell et al., 2000; Lachance et al., 2003; Sipiczki, 2003; Lopandic et al., 2006; Gomes et al., 2007; Lopandic et al., 2008). O sequenciamento desta região é suficiente para a delimitação das espécies (Kurtzman & Robnett, 1998), e, no presente estudo, foi utilizado para identificar as espécies associadas ao ecossistema vinícola. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar as leveduras isoladas a partir de polpa fermentada de uva (*Vitis vinifera* L.) por meio de sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostragem

As coletas aconteceram entre julho e setembro de 2008 na Fazenda Ouro Verde/Miolo, Vale do São Francisco, município de Casa Nova, Bahia, Brasil. As cultivares de uvas tintas amostradas foram: Tempranillo, Cabernet Sauvignon e Grenache; e as uvas brancas foram: Sauvignon blanc e Verdejo. Seis pontos de amostragem, em cada lote dos cinco cultivares de uvas, foram escolhidos aleatoriamente, numa distância aproximadamente entre os pontos de 80 a 100 m. As coletas foram realizadas, assepticamente, sendo que de 1 a 2 kg de uvas foram coletados em sacos plásticos estéreis, transportados refrigerados e enviados para processamento no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Sergipe. As uvas foram processadas em, no máximo, 48 horas após a coleta.

2.2 Fermentação espontânea e isolamento das leveduras

No laboratório, as uvas coletadas foram esmagadas nos sacos estéreis da coleta para extração do suco, sendo 500 mL transferidos para frascos estéreis para iniciar o processo de fermentação espontânea, à temperatura de 21°C. A fermentação foi acompanhada até a redução de aproximadamente 60% (cerca de 70g/L) dos açúcares totais em °Brix e/ou até no tempo limite de 15 dias.

Após o final das fermentações, foram preparadas as diluições decimais de cada amostra. O inóculo de cada diluição foi realizado em triplicata, utilizando 0,1 mL de suspensão, de diluições decimais apropriadas (10^{-4} e 10^{-6}). O meio utilizado para isolamento das leveduras foi o agar YM (“yeast extract-malt extract agar”, glicose 1%, extrato de malte 0,3%, extrato de levedura 0,3%, peptona 0,5% e ágar 2%, acrescidos de 0,001% de cloranfenicol). O agar YCB (Yeast Carbon Base

1,17%, agar 2%, acrescido de lisina 0,056% com 0,001% de cloranfenicol) foi utilizado para o isolamento de leveduras não-*Saccharomyces*, sendo empregado, em triplicata, as diluições de 10^{-2} e 10^{-4} . As placas foram incubadas à 27°C por três a sete dias. Após este período, foram purificados 10 isolados das placas de maior diluição (com a presença de 30 a 300 colônias) do morfotipo dominante e, um exemplar de cada morfotipo diferente, nas placas de agar YM e nas placas de YCB lisina para posterior identificação.

2.3 Identificação das leveduras

As análises das características macromorfológicas como tamanho, forma, elevação, borda, cor, textura foram observadas após o crescimento colonial dos morfotipos isolados. Logo a seguir os isolados foram testados em relação à capacidade de fermentar e assimilar diferentes fontes de carbono, termotolerância, osmotolerância e resistência ao etanol (Kreger-van Rij, 1984; Van der Walt & Yarrow, 1984), sendo estes dois últimos testes realizados apenas para os isolados de *S. cerevisiae*. Os isolados foram identificados segundo métodos descritos por Yarrow (1998), utilizando as chaves taxonômicas presentes em Kurtzman & Fell (1998).

2.4 Caracterização molecular das leveduras não-Saccharomyces

Extração do DNA Total

Os isolados de não-*Saccharomyces* agrupados pela caracterização morfo-fisiológica foram submetidos à extração do DNA total pelo seguinte procedimento: as leveduras foram crescidas em meio agar YM por 24h à 25°C. Após crescimento foram ressuspensas em 100 µL de tampão de lise (1M Tris-HCl, 0,5 M EDTA, 5M NaCl, 10% SDS e água destilada) e incubadas a 65°C por 35 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µL de fenol:clorofórmio:isopropílico (25:24:1) e

homogeneizados em agitador do tipo vortex por 3 minutos. A suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 13.000 rpm, e o sobrenadante foi transferido com o auxílio da pipeta para um novo microtubo e adicionados 100 µL de etanol 70% gelado. Uma nova centrifugação a 13.000 rpm por 3 minutos foi então realizada. O etanol foi removido com auxílio da pipeta, e o DNA deixado a temperatura ambiente durante a noite (*overnight*) para evaporação de todo o etanol. Para reidratação do DNA foram adicionados 100 µL de TE pH 8, homogeneizados em agitador do tipo vortex por 5 segundos, incubados em banho-maria à 37°C por 15 minutos e congelados para serem utilizados posteriormente.

PCR das regiões de microsátélites (GTG)₅

Após a extração do DNA total foram realizadas as reações de PCR das regiões de microsátélites com o iniciador (GTG)₅, utilizando o termociclador PCR Express (Thermo Hybaid). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25µL contendo 2,5 µL de tampão de PCR 10X, 1,5 µL de MgCl₂ 1,5M, 1 µL de dNTP 10mM (2,5mM cada), 2 µL da solução do iniciador (GTG)₅ a 10 pmol⁻¹, 1 a 5 µL do DNA, 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase 1,25 U e água milli-Q q.s.p. suficiente para completar o volume final. O programa de ciclagem consistiu de um ciclo de desnaturação à 94°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de 45 segundos de desnaturação à 93°C, 1 minuto de anelamento do iniciador à 50°C e 1 minuto de extensão à 72°C, e uma extensão final por 6 minutos à 72°C. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% a 100 V por 150 minutos em tampão TBE 0,5X e corados com brometo de etídio por 15 minutos. Os perfis de banda puderam ser visualizados com auxílio de luz ultravioleta e fotografados utilizando um sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat, France). Com a visualização dos perfis de bandeamento, as leveduras foram agrupadas de acordo com os perfis moleculares obtidos.

Sequenciamento da região D1D2 da subunidade maior do gene do rRNA

Um isolado de cada grupo baseado no perfil molecular obtido com o iniciador (GTG)₅ teve a região D1/D2 da subunidade maior do rDNA sequenciada. Para a reação de PCR foram utilizados os iniciadores NL-1 (5'- GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'- GGTCCTGTGTTTCAAGACGG-3'), segundo LACHANCE et al. (1999). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de tampão de PCR "high fidelity" 10X, 2 µL de MgSO₄ 50mM, 2 µL de dNTP 10 mM (2,5 mM cada), 1 µL dos iniciadores NL1 e NL4 a 10 pmol⁻¹ (MWG Biotech), 1 a 5 µL do DNA, 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase 1 U/µL (Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase High Fidelity) e água milli-Q q.s.p. 50 µL. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o termociclador PCR Express (Thermo Hybaid). O programa de ciclagem teve uma desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 15 segundos de desnaturação à 94°C, 25 segundos de anelamento do iniciador à 54°C e 20 segundos de extensão à 68°C, e uma extensão final por 10 minutos à 68°C. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X (54 g de Tris Base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0) durante aproximadamente 1 h a 120 V. Os produtos foram corados com solução de brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de fotodocumentação de gel (Vilber Lourmat, France).

Os produtos de PCR foram purificados por meio da técnica com Polietilenoglicol (PEG). Foi adicionado ao produto de PCR um volume igual de Polietilenoglicol 20% em NaCl 2,5 M. Após incubar à 37°C por 15 minutos, foi realizada uma centrifugação a 13.500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado com auxílio de pipeta. A seguir, foram adicionados 125 µL de etanol 70-80% gelado, e realizada uma nova centrifugação a 13.500 rpm por dois minutos. O etanol foi removido com auxílio da pipeta. A adição de etanol e as etapas seguintes foram repetidas. Novamente uma centrifugação a 13.200 rpm por um segundo foi realizada e o DNA foi deixado à

temperatura ambiente para evaporação de todo o excesso de etanol. A reidratação foi efetuada pela adição de 10 µL de água, homogeneização em agitador do tipo vortex por 15 segundos e incubação à 37°C por 10 minutos. O produto obtido foi dosado em aparelho NanoDrop ND 1000. As reações de sequenciamento foram realizadas usando o kit DYEnamic™ (Amersham Biosciences, USA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado MegaBACE™ 1000. O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM – ICB - UFMG).

As sequências de DNA foram analisadas utilizando o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool - versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) desenvolvido pelo National Center For Biotechnology (Altschul et al., 1997). As sequências obtidas foram comparadas com as já depositadas no GenBank, e as sequências similares foram alinhadas usando o programa CLUSTALW software package (EMBL-EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Para ser considerada pertencente a uma espécie conhecida, o isolado apresentou similaridade na sequência analisada de 99% ou mais em relação à outra já depositada no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). Microrganismos que apresentaram sequências com similaridade menor ou igual a 98% na região do DNA analisada foram designados com o termo “similar”, e podem representar uma nova espécie. De acordo com Kurtzman e Robnett (1998), o poder discriminatório das sequências da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA é considerado suficiente para descrever novas espécies de leveduras, pois isolados da mesma espécie apresentam no máximo de duas a três bases diferentes não-contíguas em uma região de cerca de 600 nucleotídeos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento e identificação das leveduras

Das cinco cultivares de uvas para vinho foram obtidos 155 isolados de *S. cerevisiae* e 60 de não-*Saccharomyces* (figura 1), totalizando 215 isolados de leveduras. O tempo de fermentação dos mostos para isolamento e seleção das leveduras foi dividido em dois grupos. As cultivares Tempranillo, Verdejo, Sauvignon blanc ficaram no 1º grupo, cujo mosto fermentou entre 7 e 8 dias; no 2º grupo ficaram as cultivares Cabernet Sauvignon e Grenache, que fermentaram entre 13 e 15 dias.

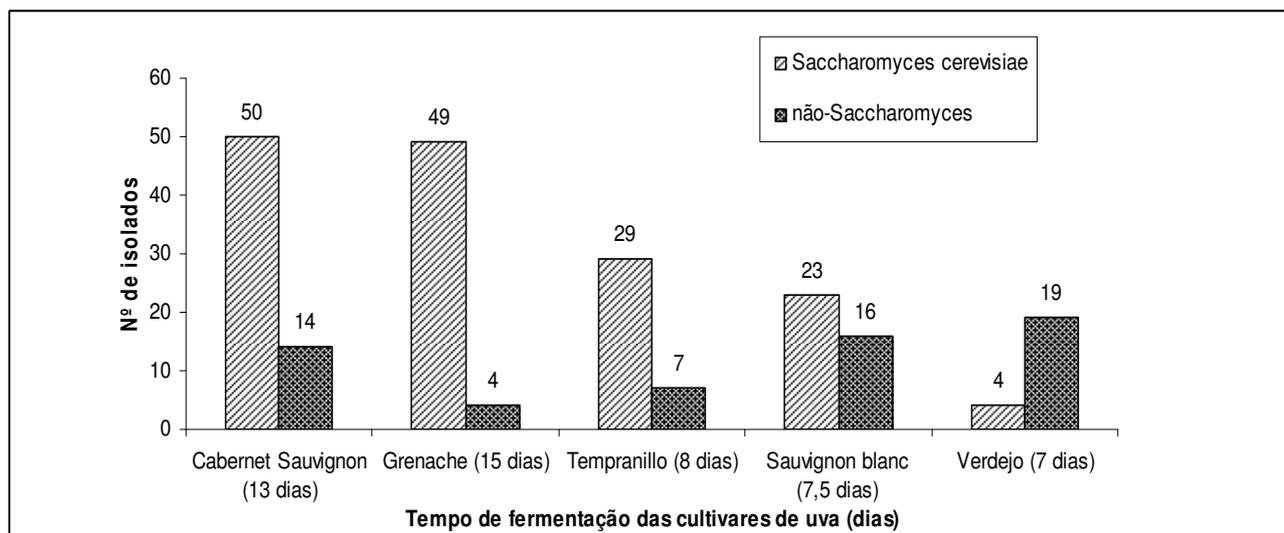


Figura 1. Número de isolados de *Saccharomyces cerevisiae* e não-*Saccharomyces* encontrados nos mostos fermentados das variedades de uva (*Vitis vinifera* L.) por tempo de fermentação.

Os mostos das cultivares do 1º grupo apresentaram total de 99 isolados, sendo 56 de *S. cerevisiae* e 42 de não-*Saccharomyces*, menor que o 2º grupo (117 isolados, sendo 99 de *S. cerevisiae* e 18 de não-*Saccharomyces*). Tal diferença pode estar relacionada ao tempo de fermentação que, nas primeiras foi menor (em média de 7 a 8 dias). Possivelmente, o tempo de fermentação é um fator que influenciou no aparecimento das populações de *S. cerevisiae*. Quanto maior o tempo de fermentação maior a quantidade de etanol produzida, e isto favorece o

crescimento de linhagens resistentes a este composto no mosto em fermentação (Polsinelli et al. 1996; Sniegowski et al. 2002).

3.1.1 Caracterização fisiológica das *Saccharomyces cerevisiae*

Dos 155 isolados de *S. cerevisiae*, 149 fermentaram a glicose entre 24 e 48h. Este resultado é importante para o processo de vinificação, pois a produção rápida de álcool é interessante para a produção de bebidas fermentadas. Cento e cinquenta e cinco isolados cresceram à 37°C e 137 à 40°C. Durante a fermentação o açúcar disponível é metabolizado como fonte de energia, no entanto parte da energia gerada é perdida na forma de calor, assim a temperatura do mosto é aumentada durante a fase ativa da fermentação (Fugelsang & Edwards, 2007), o que explica a importância em se ter leveduras que possam resistir a temperaturas elevadas.

Os mostos das uvas pesquisadas tiveram teores de sólidos solúveis totais entre 17 a 23°Brix, salientando a importância de se encontrar leveduras osmotolerantes (resistentes a elevadas concentrações de glicose) para a produção de vinho. De acordo com os testes de osmotolerância realizados para os isolados de *S. cerevisiae*, todos os isolados cresceram nos meios com 20% e 30% de glicose; já em meio com 50% de glicose, 145 isolados cresceram.

Todos isolados de *S. cerevisiae* cresceram entre 24 e 48h nas concentrações de 6, 8, 10 e 12 g/L de etanol. Trabalhos relacionados com isolamento de *S. cerevisiae* na presença de etanol são descritos por Polsinelli et al. (1996) e Sniegowski et al. (2002) e indicaram o etanol como um fator seletivo ao desenvolvimento de linhagens de *S. cerevisiae*, assim como também foi evidenciando neste estudo. A capacidade de sobrevivência das leveduras em concentrações elevadas de etanol é uma característica importante para a seleção de linhagens fermentadoras na produção de vinho, assim como a osmotolerância, fermentação da glicose e termotolerância das mesmas (Pretorius, 2000). A maioria das linhagens isoladas de *S. cerevisiae* neste trabalho apresentou características

favoráveis para a fermentação alcoólica, de acordo com os quatro fatores seletivos citados anteriormente, deste modo sugerindo serem possíveis candidatas na utilização da produção de vinhos da região do Vale do São Francisco.

3.1.2 *Caracterização morfo-fisiológicas e molecular das leveduras não-Saccharomyces*

Dos 60 isolados de leveduras não-*Saccharomyces*, 40 fermentaram a glicose, 42 cresceram à temperatura de 37°C e 36 à temperatura de 40°C. De acordo com Fleet (2008), uma das características seletivas para uma levedura ser utilizada como iniciadora nas fermentações é a capacidade de fermentar e de crescer em elevadas temperaturas. No presente trabalho, os isolados que fermentaram e cresceram nas duas temperaturas testadas podem ser considerados como potenciais candidatos a se tornarem culturas iniciadoras das fermentações para a produção de vinho na região, contudo mais estudos precisam ser realizados.

Pela identificação convencional, os 60 isolados de não-*Saccharomyces* foram distribuídos em dez grupos morfo-fisiológicos diferentes (tabela 1). Destes, apenas três isolados (todos identificados como *Kloeckera apis*) puderam ser identificados ao nível de espécie utilizando somente estes testes (Grupo A). Nove isolados foram agrupados no Grupo B (grupo de isolados com coloração vermelha), nove no Grupo C (grupo de isolados com coloração laranja), um no Grupo D, dois no Grupo E, onze no Grupo F, dois no Grupo G, seis no Grupo H, sete no Grupo I e dez no grupo J. Em seguida, um representante de cada morfotipo pertencente aos Grupos de B a E foi selecionado para a extração do DNA e sequenciamento da região D1/D2 do gene do rRNA. Os 36 isolados pertencentes aos Grupos de F a J foram analisados por meio da amplificação das regiões microssatélites (GTG)₅ para serem reagrupados de acordo com os perfis moleculares, para posterior sequenciamento.

Por meio da PCR das regiões de microssatélites, os 36 isolados (Grupos de F a J) foram agrupados em 19 padrões moleculares diferentes. Um exemplar de cada grupo, menos do Grupo A

(*Kloeckera apis*), totalizando 23 isolados (vinte e três grupos), tiveram a região D1/D2 do gene do rRNA sequenciada. Nas figuras 2 e 3 são mostrados os géis da PCR das regiões microsatélites (GTG)₅ indicando o polimorfismo encontrado nos 36 isolados submetidos a esta análise.

Tabela 1. Grupos formados pela identificação fisiológica das leveduras não-*Saccharomyces*

Grupo de não- <i>Saccharomyces</i>	Número de isolados
A	3 – <i>Kloeckera apis</i> (AI, AII, AIII)
B	9* (BI, BII, BIII, BIV, BV, BVI, BVII, BVIII, BIX)
C	9* (CI, CII, CIII, CIV, CV, CVI, CVII, CVIII, CIX)
D	1* (DI)
E	2* (EI, EII)
F	11* (FI, FII, FIII, FIV, FV, FVI, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI)
G	2* (GI, GII)
H	6* (HI, HII, HIII, HIV, HV, HVI)
I	7* (II, III, IIII, IIV, IV, IVI, IVII)
J	10* (JI, JII, JIII, JIV, JV, JVI, JVII, JVIII, JIX, JX)

*Isolados não identificados ao nível de espécie pela identificação morfo-fisiológica.

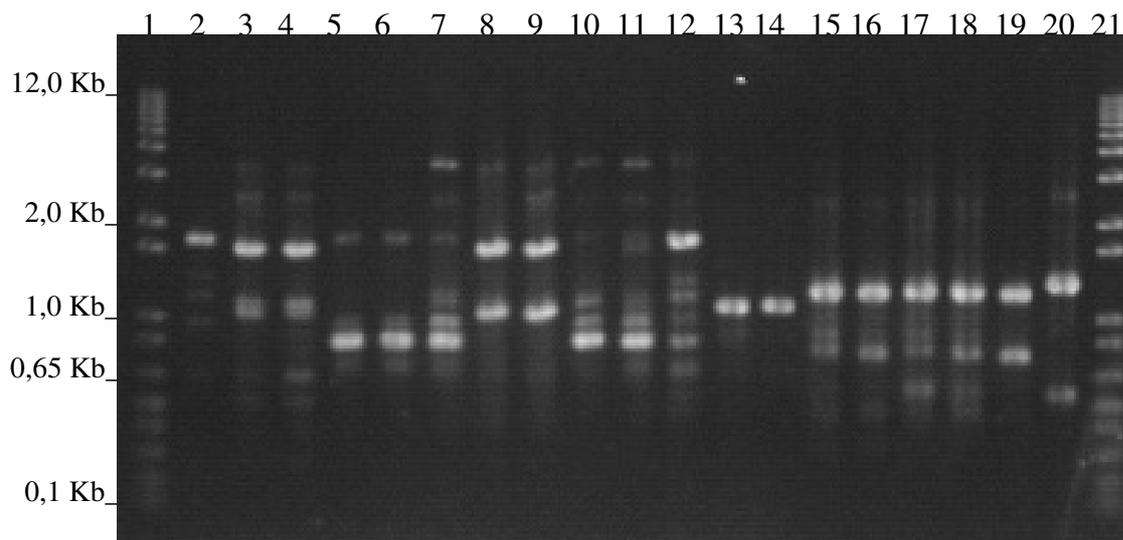


Figura 2 – Polimorfismo dos isolados de leveduras analisado pela PCR das regiões microssatélites (GTG)₅. 1= padrão molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); 2= isolado FI; 3= isolado FII; 4= isolado FIII; 5= isolado FIV; 6= isolado FV; 7= isolado FVI; 8= isolado FVII; 9= isolado FVIII; 10= isolado FIX; 11= isolado FX; 12= isolado FXI; 13= isolado GI; 14= isolado GII; 15= isolado HI; 16= isolado HII; 17= isolado HIII; 18= isolado HIV; 19= isolado HV; 20= isolado HVI; 21= padrão molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

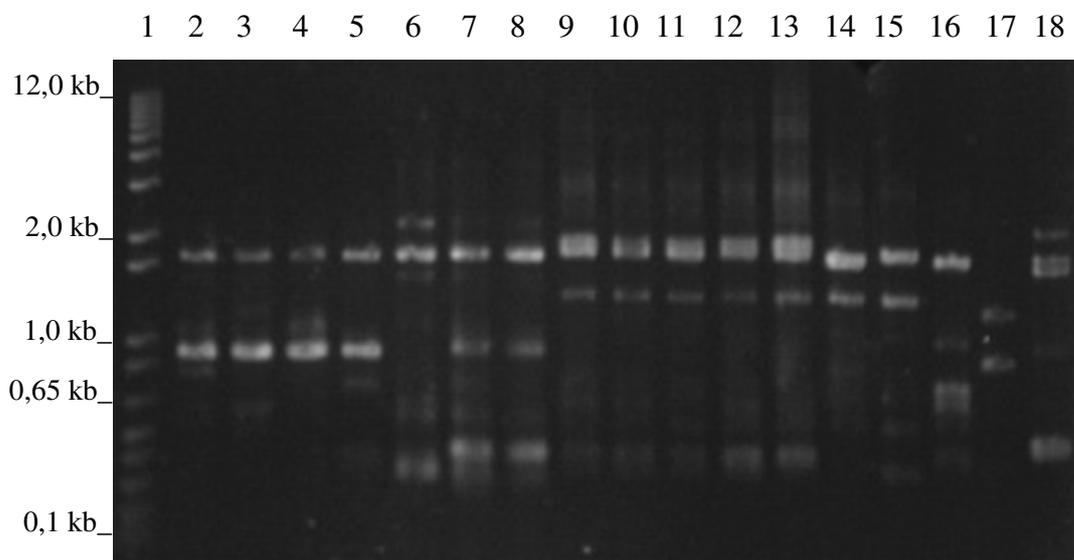


Figura 3 – Polimorfismo dos isolados de leveduras analisado pela PCR das regiões microssatélites (GTG)₅. 1= padrão molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); 2= isolado II; 3= isolado III; 4= isolado IIII; 5= isolado IIIV; 6= isolado IV; 7= isolado IVI; 8= isolado IVII; 9= isolado JI; 10= isolado JII; 11= isolado JIII; 12= isolado JIV; 13= isolado JIV; 14= isolado JVI; 15= isolado JVII; 16= isolado JVIII; 17= isolado JIX; 18= isolado JX.

3.1.3 Identificação molecular das não-Saccharomyces

Dos 23 isolados que foram submetidos ao sequenciamento da região D1/D2 do gene do rRNA, vinte foram identificados em nível de espécie (tabela 2). Três isolados (FVII, FIX e IIV) encontram-se ainda em fase de sequenciamento. A porcentagem de isolados encontrados por espécie identificada apresenta-se na tabela 2 e a porcentagem das espécies encontradas nas uvas (*Vitis vinifera* L.) na figura 4.

Tabela 2. Identificação molecular de leveduras não-*Saccharomyces* pelo sequenciamento da região D1/D2 do gene do rRNA dos isolados representantes dos seus respectivos agrupamentos formados pela identificação fisiológica e pelo (GTG)₅.

Agrupamento pela identificação fisiológica	Códigos dos representantes dos agrupamentos pelo (GTG) ₅	Espécies de não- <i>Saccharomyces</i> identificadas	Porcentagem das espécies (%)	Filo
		<i>Pichia</i>	13,3	
J	JIV, JVII, JVIII	<i>kudriavzevii</i>		Ascomycota
		<i>Pichia</i>	11,7	Ascomycota
F	FI, FIII, FIV, FVI, FXI	<i>guilliermondii</i>		
G	GI	<i>Pichia galeiformis</i>	3,3	Ascomycota
		<i>Wickerhamomyces</i>	11,6	Ascomycota
I	II, IV, IVI	<i>anomalus</i>		
		<i>Wickerhamomyces</i>		
J	JIX	<i>anomalus</i>		
		<i>Rhodotorula</i>	30,0	Basidiomycota
C	CI	<i>mucilaginosa</i>		
		<i>Rhodotorula</i>		
B	BI	<i>mucilaginosa</i>		
		<i>Cândida</i>	13,3	Ascomycota
E	EI	<i>parapsilosis</i>		
		<i>Candida</i>		Ascomycota
H	HI, HVI	<i>parapsilosis</i>		
		<i>Cândida</i>	1,7	Ascomycota
D	DI	<i>orthopsilosis</i>		
		<i>Cândida</i>	1,7	Ascomycota
J	JX	<i>zemlinina</i>		
A (AI, AII, AIII)	*	<i>Kloeckera apis</i>	5,0	Ascomycota
Total de isolados de não- <i>Saccharomyces</i>		60		
Total de isolados identificados de não- <i>Saccharomyces</i>		55		

**Kloeckera apis* foi identificada apenas pela identificação fisiológica.

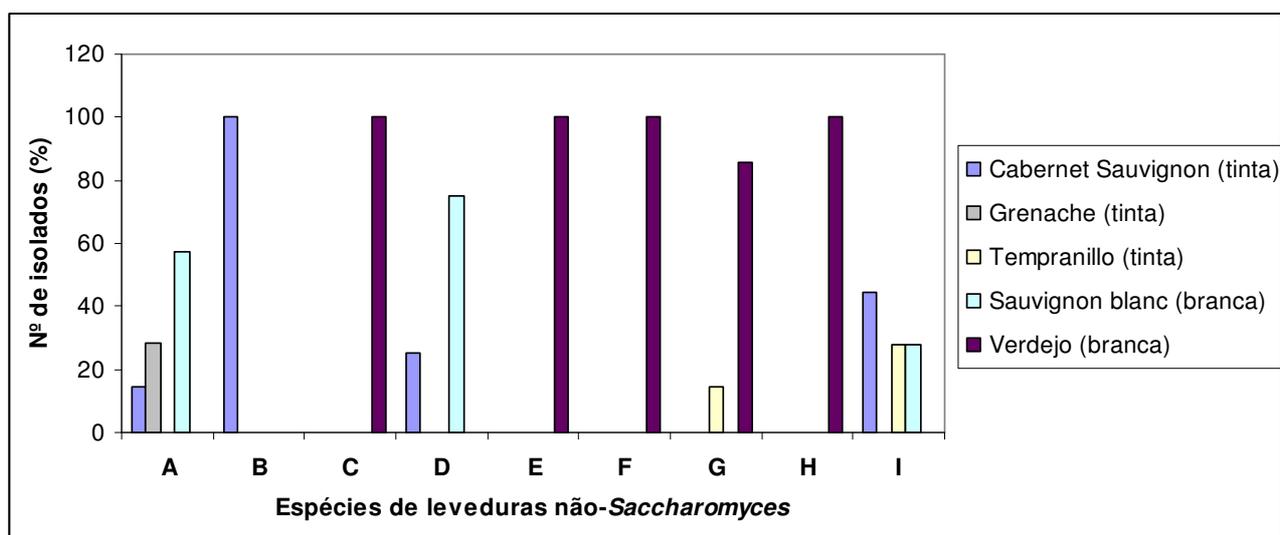


Figura 4. Ocorrência do número de isolados (em porcentagem) de leveduras não-*Saccharomyces* nos mostos fermentados das variedades de uvas (*Vitis vinifera* L.). A – *Pichia guilliermondii*; B – *P. galeiformis*; C – *P. kudriavzevii*; D – *Candida parapsilosis*; E – *C. zemplinina*; F – *C. orthopsilosis*; G – *Wickerhamomyces anomalus*; H – *Kloeckera apis*; I – *Rhodotorula mucilaginosa*.

As espécies de não-*Saccharomyces* identificadas pelo sequenciamento foram *Pichia kudriavzevii*, *P. guilliermondii*, *P. galeiformis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. zemplinina*, *Wickerhamomyces anomalus*, e pela identificação convencional *Kloeckera apis*. Os isolados de leveduras que apresentaram de zero a três nucleotídeos diferentes nas suas sequências foram identificados como leveduras da mesma espécie e os que apresentaram de quatro ou mais nucleotídeos diferentes foram identificados como espécies diferentes (Kurtzman & Robnett, 1998).

Espécies de não-*Saccharomyces* do gênero *Pichia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Kloeckera* também foram isoladas em outros trabalhos que envolvem o mosto fermentado de uva (Esteve-Zaroso et al., 2000; Jemec et al., 2001; Clemente-Jimenez et al., 2004; Clemente-Jimenez et al., 2005; Lopandic et al., 2006; González et al., 2007; Lopandic et al., 2008; Urso et al., 2008; Barrajón et al., 2009; Chavan et al., 2009). A espécie de levedura não-*Saccharomyces* em maior número, num total de sessenta, foi *Rh. mucilaginosa* (30%), seguida por *P. kudriavzevii* e *C. parapsilosis*, ambas com 13,3%; *P. guilliermondii* (11,7%), *W. anomalus* (11,6%), *K. apis* (5,0%) e

P. galeiformis ambas com 3,3%, e em menor porcentagem *C. orthopsilosis* e *C. zemplinina*, ambas com 1,7%. De La Torre et al. (1999) sugerem que os gêneros *Rhodotorula* e *Cryptococcus* estão entre as mais frequentes nas uvas e as leveduras apiculadas (*Kloeckera* spp.) as mais escassas. Entretanto, em Lopandic et al. (2008), as leveduras apiculadas geralmente são uma das mais frequentes nas uvas e mostos fermentados. No presente estudo, *Rh. mucilaginosa* (30%) foi a espécie não-*Saccharomyces* mais encontrada nos isolamentos. Este gênero cosmopolita já foi isolado de diversos substratos como pimentas vermelhas na Espanha, larvas de moscas da fruta no Havaí, cerveja pasteurizada em Tóquio e Itália, além de em humanos (Kurtzman & Fell, 1998).

González et al. (2007), estudando a biodiversidade de leveduras em fermentações dos vinho da região Tenerife (Espanha), encontraram quase a metade das espécies nos mostos (46,73%) pertencentes ao gênero *Candida*, incluindo *C. parapsilosis*. Outras espécies de leveduras não-*Saccharomyces* também foram isoladas como *Rhodotorula mucilaginosa*, *Hanseniaspora uvarum* (teleomorfo de *Kloeckera apis*), *P. guilliermondii*. Estes resultados são similares aos encontrados no presente estudo.

Wickerhamomyces anomalus apresentou a frequência de 11,6% neste trabalho. Esta espécie é um contaminante de fermentações industriais, sendo muito encontrada nos vinhos. Outra espécie encontrada no presente estudo foi *P. guilliermondii* que é isolada do mosto de uva e em equipamentos de vinificação (Kurtzman & Fell, 1998; Fugelsang & Edwards, 2007; Barrajon et al., 2009).

C. zemplinina é uma das espécies isoladas neste trabalho e que já foi isolada nos mostos fermentados de uvas botritizadas na região vinícola de Tokaj (Hungria) (Sipiczki, 2003), uvas botritizadas da Califórnia (Mills et al., 2002) e de mosto de uvas das fermentações espontâneas de regiões vinícolas da Áustria (Lopandic et al., 2008). Isto sugere que esta levedura esteja relacionada com mostos fermentados de uvas e provavelmente com este tipo de ambiente de fermentação.

A diversidade de leveduras no ambiente de vinhedo pode ser estudada ao selecionar isolados das bagas de uva, do solo, equipamentos vinícolas, do próprio vinho, entre outros. No entanto, a diversidade e predominância das leveduras selecionadas não serão, necessariamente, encontradas nos diversificados microambientes do mesmo vinhedo, já que os diferentes fatores seletivos encontrados em cada um são o que irá delimitar a população das espécies de leveduras.

Os fatores seletivos encontrados nas fermentações espontâneas nos mostos das uvas (*Vitis vinifera* L.) utilizadas neste trabalho para selecionar as leveduras, como temperatura do mosto e concentração de álcool e de açúcar, entre outros fatores, contribuíram para o isolamento das populações de leveduras encontradas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii*, *P. guilliermondii*, *P. galeiformis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. zemplinina*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Kloeckera apis*, deste modo mostrando ser um ambiente favorável para o isolamento destas espécies.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa de mestrado e auxílio financeiro, ao FINEP pelo apoio financeiro (projeto INOVASE) e à Fazenda Ouro Verde/Miolo (BA) pela doação das uvas e apoio científico.

REFERÊNCIAS

- Altschul, S. F., Madden, T.L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Barrajón, N., Arévalo-Villena, M., Rodríguez-Aragón, L. J., Briones, A., 2009. Ecological study of wine yeast in inoculated vats from La Mancha region. *Food Control* 20, 778–783.

- Chavan, P., Mane, S., Kulkarni, G., Shaikh, S., Ghormade, V., Nerkar, D. P., Shouche, Y., Deshpande, M. V., 2009. Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. *Food Microbiol.* 26, 801–808.
- Cappello, M.S., Bleve, G., Grieco, F., Dellaglio, F., Zacheo, G., 2004. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *J. Appl Microbiol.* 97, 1274–1280.
- Clemente-Jimenez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J., Rodríguez-Vico, F., 2004. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiol.* 21, 149–155.
- Clemente-Jimenez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J., Rodríguez-Vico, F., 2005. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 301-308.
- Cocolin, L., Bisson, L. F., Mills, D. A., 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol. Letters* 189, 81-87.
- De La Torre, M. J., Millan, M. C., Perez-Juan, P. M., Morales, J., Ortega, J. M., 1999. Indigenous yeasts associated with two *Vitis vinifera* grape varieties cultured in southern Spain. *Microbios* 100, 27–40.
- Demuyter, C., Lollier, M., Legras, J.-L., Le Jeune, C., 2004. Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery. *J. Appl. Microbiol.* 97, 1140–1148.
- Esteve-Zarzoso, B., Gostínar, A., Bobet, R., Uruburu, F., Querol, A., 2000. Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the ‘El Penedès’ area (Spain). *Food Microbiol.* 17, 553-562.

- Fell, J. W., Boekhout, T., Fonesca, A., Scorzetti, G., Statzell-Tallman, A., 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1351–1371.
- Fernández-Espinar, M. T., López, V., Ramón, D., Bartra, E., Querol, A., 2001. Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 1–10.
- Fleet, G. H., 2001. Wine. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC, pp.747-772.
- Fleet, G. H., 2003. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 11–22.
- Fleet, G. H., 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* 8, 979–995.
- Fleet, H., Heard, G. M., 1993. Yeasts: growth during fermentation. In: Fleet, H. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp.27-55.
- Frezier, V., Dubourdiou, D., 1992. Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 375–380.
- Fugelsang, K. C., Edwards, C. G., 2007. *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*. 2^a ed. New York: Springer.
- GOMES, F. C. O., 2006. Produção de cachaça artesanal utilizando linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* e por fermentação espontânea, com a caracterização química e sensorial da bebida e das bactérias do ácido láctico associadas ao processo. Belo Horizonte: Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, 120p. (Tese de Doutorado).
- Gomes, F. C. O., Silva, C. L., Marini, M. M., Oliveira, E.S., Rosa, C.A., 2007. Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2438-2447.

- González, S. S., Barrio, E., Querol, A., 2007. Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain). *J. Appl. Microbiol.* 102, 1018–1025.
- Guerra, J. B., Araújo, R. A. C., Pataro, C., Franco, G. R., Moreira, E. S. A., Mendonça-Hagler, L. C., Rosa, C. A., 2001. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 106-111.
- Jemec, K. P., Cadez, N., Zagorc, T., Bubic, V., Zupec, A., Raspor, P., 2001. Yeast population dynamics in five spontaneous fermentations of Malvasia must. *Food Microbiol.* 18, 247-259.
- Kreger-Van Rij, N.J.W., 1984. *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
- Kurtzman, C. P., Fell, J., 1998. *The yeasts - a taxonomic study*. 4th. ed. Elsevier Science Pub. B. V. Amsterdam, the Netherlands.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., 2006. Yeast systematics and phylogeny - implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, The Yeast Handbook*, Rosa CA & Péter G (eds). Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 11-30.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek.* 73, 4, 331- 371.
- Lachance, M. A., Daniel, H. M., Meyer, W., Prasad, G. S., Gautam, S. P., Boundy-Mills, K., 2003. The D1/D2 domain of the large subunit rDNA of the yeast species *Clavispora lusitaniae* is unusually polymorphic. *FEMS Yeast Res.* 4, 253–258.
- Lehtonen, M., Jounela-Eriksson, P., 1983. Volatile and non-volatile compounds in the flavour of alcoholic beverages. In: PIGGOTT, J. R. *Flavour of distilled beverages: Origin and Development*. Florida: Verlag Chemie Internacional Inc., pp.64-78.

- Lopandic, K., Zelger, S., Bánszky, L. K., Eliskases-Lechner, F., Prillinger, H., 2006. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiol.* 23, 341–350.
- Lopandic, K., Tiefenbrunner, W., Gangl, H., Mandl, K., Berger, S., Leitner, G., Abd-Ellah, G. A., Querol, A., Gardner, R. C., Sterflinger, K., Prillinger, H., 2008. Molecular profiling of yeasts isolated during spontaneous fermentations of Austrian wines. *FEMS Yeast Res.* 8, 1063–1075.
- Mills, D. A., Johannsen, E. A., Cocolin, L., 2002. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4884–4893.
- Oliveira, E. S.; Cardello, H. M. A. B.; Jeronimo, E. M.; Souza, E. L. R.; Serra, G. E., 2005. The influence of different yeasts on the fermentation, composition and sensory quality of cachaça. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 707-715.
- Pataro, C., Guerra, J. B, Petrillo-Peixoto, M. L, Mendonça-Hagler, L. C, Linardi, V. R, Rosa, C. A., 2000. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 88, 1-9.
- Polsinelli, M., Romano, P., Suzzi, G., Mortimer, R., 1996. Multiple strains of *Saccharomyces cerevisiae* on a single grape vine. *Lett. Appl. Microbiol.* 23, 110- 114.
- Pretorius, I. S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millenium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 8, p. 675-729.
- Querol, A., Fleet, G. H. (Eds), 2006. *Yeasts in Food and Beverages*. Springer, Heidelberg, pp.453.
- Querol, A., Ramón, D., 1996. The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends Food Sci. Technol.* 7, 73-78.
- Schuller, D., Alves, H., Dequin, S., Casal, M., 2005. Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde region of Portugal. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51, 167–177.

- Sipiczki, M., 2003. *Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 2079–2083.
- Sniegowski, P.D., Dombrowski, P.G., Fingerman, E., 2002. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS Yeast Res.* 1, 306.
- Urso, R., Rantsiou, K., Dolci, P., Rolle, L., Comi, G., Cocolin, L., 2008. Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods. *FEMS Yeast Res.* 8, 1053–1062.
- Valero, E., Cambon, B., Schüller, D., Casal, M., Dequin, S., 2007. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Res.* 7, 317–329.
- Van Der Walt, J.P., Yarrow, D., 1984. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In: *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier Publishers B. V, Amsterdam, 45-104.
- Versavaud, A., Courcoux, P., Roulland, C., Dulau, L., Hallet, J., 1995. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3521-3529.
- Yarrow, D., 1998. Methods for isolation and identification of yeasts. In: Kurtzman, C. P., Fell, J. W. *The yeasts, a taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam, 77-100.

CAPÍTULO 2

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae*
ISOLADAS A PARTIR DE CULTIVARES DE UVA (*Vitis vinifera* L.) UTILIZADAS
NA PRODUÇÃO DOS VINHOS DO VALE DO SÃO FRANCISCO, BRASIL**

FOOD MICROBIOLOGY

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae*
ISOLADAS A PARTIR DE CULTIVARES DE UVA (*Vitis vinifera* L.) UTILIZADAS NA
PRODUÇÃO DOS VINHOS DO VALE DO SÃO FRANCISCO, BRASIL

CAMILA M. P. B. S. DE PONZZES ^a*, DÂNGELLY L. F. M. DE MÉLO ^a, CAROLINE A.
SANTANA ^a, GIULIANO E. PEREIRA ^b, ANTÔNIO M. BARBOSA JUNIOR ^a, RITA C.
TRINDADE ^a, CARLOS A. ROSA ^c

^a Laboratório de Microbiologia Aplicada, Departamento de Morfologia - Universidade
Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon, s/n, Jd Rosa Else. CEP: 49.100-000 - São
Cristóvão, SE - Brasil

^b Pesquisador Embrapa Uva e Vinho/Semi-Árido BR 428, Km 152, Zona Rural - Caixa Postal
23 - CEP 56302-970 - Petrolina, PE - Brasil

^c Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras / Departamento de Microbiologia -
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais Av. Antônio Carlos,
6627 - Pampulha - C.P. 486 - CEP 31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil

* Corresponding author

Tel.: 55 079 21056628

E-mail address: camiladeponzzes@hotmail.com

RESUMO

Saccharomyces cerevisiae é a levedura mais utilizada como iniciadora da fermentação na produção de vinhos. Os produtores de vinhos buscam cada vez mais dar tipicidade às suas bebidas e sabe-se que isto é possível quando se utilizam leveduras indígenas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar linhagens de *S. cerevisiae*, pela técnica de restrição do DNA mitocondrial (RFLP-mtDNA), isoladas do mosto fermentado de cinco variedades de uva (*Vitis vinifera* L.) utilizadas para a produção de vinhos no Vale do São Francisco, Brasil. Das variedades coletadas foram isolados e identificados 155 isolados de *S. cerevisiae*. A análise do RFLP-mtDNA utilizando a enzima de restrição *Hinf* I foi realizada para os 155 isolados de *S. cerevisiae* proveniente dos mostos de uva, juntamente com seis linhagens comerciais. Cinco perfis de restrição do mtDNA foram encontrados para as linhagens de *S. cerevisiae* isoladas. Destes, quatro perfis de restrição foram diferentes das linhagens comerciais de *S. cerevisiae* utilizadas na região. O uso desta ferramenta molecular possibilitou encontrar linhagens indígenas de *S. cerevisiae* do Vale do São Francisco.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, Vale do São Francisco, *Vitis vinifera* L., RFLP-mtDNA, *Hinf* I, Leveduras indígenas

1 INTRODUÇÃO

Saccharomyces cerevisiae é a espécie de levedura mais utilizada na produção de vinhos como iniciadora nas fermentações. Cada vez mais os produtores de vinhos buscam dar tipicidade as suas bebidas, sendo que isto é possível quando se utiliza leveduras indígenas nos processos de fermentação. Diversos fatores interferem na qualidade das bebidas alcoólicas fermentadas, contudo, as leveduras e as condições de fermentação têm sido apontadas como os fatores que mais influenciam nas características finais dessas bebidas (Lehtonen & Jounela-Eriksson, 1983). A produção dos compostos responsáveis pelo sabor da bebida varia com as espécies e as linhagens de leveduras, assim, a contribuição destes microrganismos para a individualidade dos sabores depende do papel ecológico dos mesmos na fermentação (Fleet & Heard, 1993; Fleet, 2001; Oliveira et al. 2005; Clemente-Jimenez et al., 2005; Querol & Fleet, 2006; Gomes, 2006).

Alguns trabalhos têm mostrado que os isolados de *S. cerevisiae* podem ser obtidos a partir de uvas em fermentação, já que o álcool formado exerce papel seletivo para manutenção das linhagens de *S. cerevisiae* no ambiente fermentativo (Polsinelli et al., 1996; Sniegowski et al., 2002; Demuyter et al., 2004; Cappello et al., 2004; Schuller et al., 2005; Valero et al., 2007). Rosini (1984) mostrou que a origem de *S. cerevisiae* presente no mosto de fermentação foi do próprio estabelecimento vinícola. Este autor sugeriu que esta levedura tem a capacidade de persistir na adega colonizando superfícies e aparelhos. Mortimer & Polsinelli (1999) corroboraram o estudo anterior ao encontrar também essas leveduras em equipamentos de vinícolas. Ciani e colaboradores, em 2004, investigaram a origem das linhagens de *S. cerevisiae* envolvidas na produção de vinho e concluíram que aquelas encontradas no ambiente da vinícola, incluindo as uvas, são as responsáveis pela fermentação espontânea do

mosto de uva. Entretanto, a origem das leveduras do vinhedo ou da adega depende de vários fatores como condições climáticas, incluindo temperatura e pluviosidade, a localização geográfica da vinha, a quantidade de SO₂, aplicações de antifúngicos, a técnica de colheita, a variedade da uva, a idade da vinha e do tipo de solo (Pretorius, 2000).

A ampla distribuição de algumas linhagens de *S. cerevisiae* em determinadas regiões vinícolas e a permanência destas ao longo dos anos, sugerem a ocorrência de linhagens indígenas específicas, representantes de uma região, e a existência de relação entre origem geográfica e características genéticas destas linhagens (Veziñhet et al.,1992; Sabate et al.,1998; Esteve-Zarzoso et al., 2000). Diferentes estratégias baseadas na análise do polimorfismo de DNA têm sido utilizadas para diferenciar linhagens de *S. cerevisiae* envolvidas em fermentação alcoólica (Querol & Ramón, 1996). Estas técnicas são ferramentas poderosas, não somente para o controle industrial e tecnológico, mas também para a pesquisa ecológica da diversidade intraespecífica da microbiota indígena (Versavaud et al., 1995; Pataro et al., 2000; Guerra et al., 2001). O uso de técnicas de biologia molecular tem sido proposto para complementar as limitações da identificação feita com auxílio de testes fisiológicos, uma vez que a caracterização de linhagens atípicas, requerem a aplicação de técnicas como sequenciamento do gene do rRNA (Kurtzman & Fell, 2006). A diferenciação intraespecífica de linhagens de *S. cerevisiae* pode ser feita utilizando a análise de restrição do DNA mitocondrial, sendo esta uma técnica aceita para diferenciar tipos moleculares nesta espécie (Frezier & Dubourdiou, 1992; Esteve-Zarzoso et al., 2000; Fernández-Espinar et al., 2001; Schuller et al, 2005; Gomes et al., 2007). O objetivo deste trabalho foi caracterizar linhagens de *S. cerevisiae* obtidas do mosto fermentado de cinco variedades de uva (*Vitis vinifera* L.), utilizadas na produção dos vinhos no Vale do São Francisco, pela técnica de restrição de DNA mitocondrial.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 *Microrganismos*

Foram estudadas 155 isolados de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de uvas (*Vitis viniferas* L.) colhidas entre julho e setembro de 2008 na Fazenda Ouro Verde/Miolo, Vale do São Francisco, município de Casa Nova, Bahia, Brasil. As leveduras pertencem ao banco de linhagens do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Sergipe. As cultivares de uvas tintas colhidas para o estudo foram: Tempranillo, Cabernet Sauvignon, Grenache; e as uvas brancas foram: Sauvignon blanc e Verdejo.

2.2 *Caracterização molecular*

Os isolados de *S. cerevisiae* foram diferenciados pela análise de restrição do DNA mitocondrial (mtDNA) conforme descrito por Querol e colaboradores (1992; 1994).

2.2.1 *Obtenção do DNA mitocondrial*

Para a extração de DNA mitocondrial, as células fúngicas foram reativadas em meio agar YM por 24 a 48 h à 25°C. Posteriormente, os isolados foram crescidos em caldo YEPD (1% de extrato de levedura; 2% de peptona; 1% de glicose) por 18 horas à 25°C sob agitação de 150 rpm. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, lavadas com água destilada estéril e centrifugadas novamente. O sedimento foi ressuspensionado em 500 µL de solução de enzima lítica de

Rhizoctonia solani (25 mg/mL diluída em 1 M sorbitol, 0,1 M EDTA, pH 7,5) e incubado à 45°C por 2 horas, agitando a cada 30 minutos com delicadeza.

Passado o tempo de incubação as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, em seguida, foi descartado o sobrenadante. O sedimento foi ressuspenso em 500 µL de Tris-HCl 1 M e EDTA 0,5 mM pH 7,4, adicionado 13 µL de SDS 10% e incubado à 65°C por 5 minutos. Em seguida as amostras foram colocadas em gelo, e adicionaram-se 200 µL de acetato de potássio 5 M gelado, por 10 minutos. Após este procedimento, as células foram centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos.

O sobrenadante foi recuperado, adicionado 700 µL de isopropanol e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esta incubação, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado, o DNA lavado com 500 µL de etanol 70%, e centrifugado por 5 minutos a 14000 rpm. Depois da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o DNA foi deixado à temperatura ambiente *overnight* para evaporação do que sobrou de etanol. Quando todo o etanol foi evaporado do DNA, a re-hidratação foi realizada com 30 µL de água ultra pura estéril, e este foi congelado. A quantidade de DNA foi dosada em aparelho de NanoDrop (NanoDrop Technologies), antes da realização dos experimentos.

2.2.2 RFLP-mtDNA

A digestão foi realizada, segundo instrução do fabricante, utilizando-se 10 µL do DNA mitocondrial acrescido de 10 µL de uma solução composta por 10% da enzima de restrição *Hinf* I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 20% do tampão da enzima de restrição, 10% de RNase e 60% de água ultra pura estéril, à temperatura de 37°C por 6 h. Os produtos da digestão foram separados e analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (100 V por 150 minutos) em TBE 0,5X e coradas com brometo de etídio por 30 minutos. Os perfis de

restrição do mtDNA gerados foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados utilizando sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat, França).

Com o objetivo de constatar se as linhagens encontradas no presente estudo eram realmente indígenas ou não, foram realizadas comparações com seis linhagens comerciais de *S. cerevisiae* e *S. bayanus* utilizadas na região do Vale do São Francisco. Estas linhagens comerciais foram: *S. cerevisiae* (var. *bayanus*) da marca PDM, nomeada neste trabalho de C1; *S. cerevisiae* da marca Fermol Premier Cru (C2); *S. cerevisiae* da marca Ever Mycoferm Rouge (C3); *S. cerevisiae* da marca Fermol Rouge (C4); *S. bayanus* da marca Ever Mycoferm Cru - (C5); *S. cerevisiae* da marca Maurivin, AWRI 796 (C6).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização molecular

Cento e cinquenta e cinco isolados de *S. cerevisiae* foram submetidos à restrição do DNA mitocondrial utilizando a enzima de restrição *Hinf* I. Destes isolados foram encontrados cinco perfis moleculares diferentes (Figura 1). O baixo polimorfismo encontrado para as linhagens de *S. cerevisiae* pode estar associado à idade dos cultivares de uva da Fazenda Ouro Verde/Miolo utilizados no Vale do São Francisco. Estes cultivares foram plantados há cerca de três anos, e este tempo, pode não ter sido suficiente para a colonização das uvas por um maior número de linhagens de *S. cerevisiae*, pois um dos fatores que influencia na microbiota de leveduras nas uvas é a idade da vinha (Pretorius, 2000, Shuller et al., 2005). Schuller et al. (2005) fizeram um estudo ecológico das linhagens de *S. cerevisiae* em um vinhedo da região dos Vinhos Verdes em Portugal, por três anos consecutivos. Das 54 fermentações espontâneas estudadas, os autores obtiveram 1620 isolados de *S. cerevisiae*, com 297 perfis diferentes de

mtDNA. Possivelmente estes já eram vinhedos bem estabelecidos na região, o que explicaria a quantidade de perfis de mtDNA encontrados.

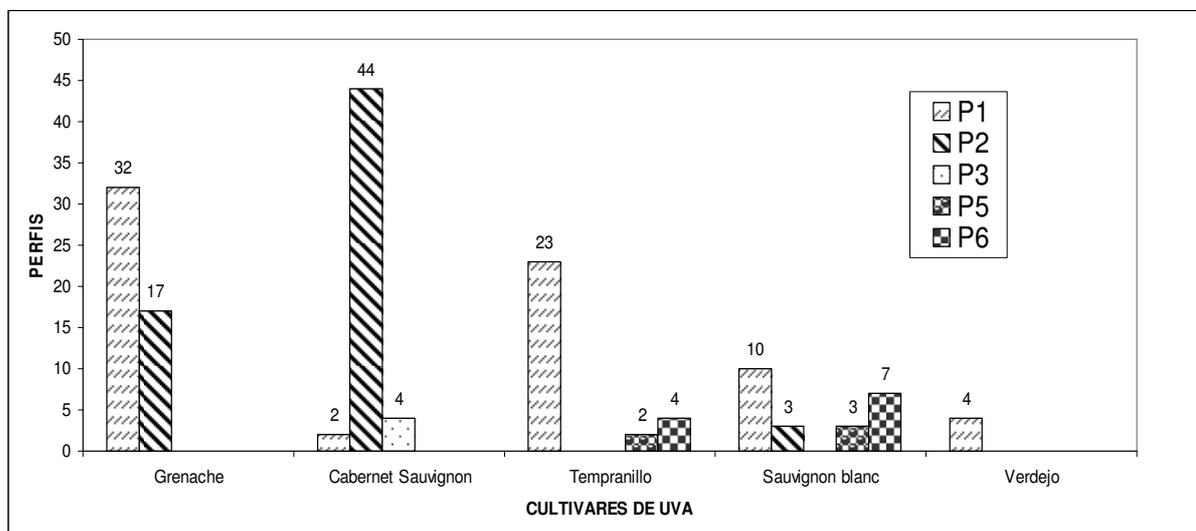


Figura 1. Perfis de restrição por mtDNA das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas das variedades de uva (*Vitis vinifera* L.) na região do Vale do São Francisco, Bahia.

Esteve-Zarzoso et al (2000) estudaram a microbiota presente nas fermentações espontâneas de vinhos produzidos com uva da área de El Penedès (Espanha). Os autores isolaram 275 leveduras de várias espécies, sendo 68 pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, apresentando 22 perfis distintos de restrição do mtDNA. Além de poder estudar o polimorfismo num ambiente de fermentação por esta técnica, Querol et al. (1992) estudaram a evolução das linhagens, inoculadas e selvagens, de *S. cerevisiae* na vinificação industrial de duas adegas diferentes (A e B) de Valencia (Espanha). Pelos perfis de restrição do mtDNA, os autores puderam observar que a linhagem inoculada predominou no processo de vinificação de ambas as adegas. Os autores também encontraram um grande número de linhagens selvagens de *S. cerevisiae* na adega A (43,9% do total das linhagens) e na adega B (34,3%). Os estudos citados acima mostram que esta ferramenta molecular possibilita a distinção de diferentes linhagens de *S. cerevisiae* associadas com os ecossistemas de fermentação.

A figura 2 mostra os perfis moleculares das seguintes linhagens comerciais de *S. cerevisiae*: *S. cerevisiae* (var. *bayanus*) da marca PDM, chamada neste trabalho de C1 que apresentou o perfil 4 (P4); *S. cerevisiae* da marca Fermol Premier Cru (C2), perfil P7; *S. cerevisiae* da marca Ever Mycoferm Rouge (C3), perfil P8; *S. cerevisiae* da marca Fermol Rouge (C4), perfil P2; *S. bayanus* da marca Ever Mycoferm Cru (C5), perfil P8; *S. cerevisiae* da marca Maurivin, AWRI 796 (C6), perfil P2. Os perfis de restrição das linhagens comerciais foram comparados com aqueles das linhagens indígenas 68 e 80 (respectivamente P1 e P3) e levedura 65 (isolada do mosto fermentado de uva), como mostrado na figura 2. As leveduras comerciais C4 e C6 apresentam o mesmo perfil de restrição de P2 (figura 2). Já as linhagens comerciais C3 e C5 apresentam o mesmo perfil de restrição, perfil P8. Na análise da figura 3, onde estão apresentados todos os perfis moleculares analisados, verifica-se, na respectiva ordem, que os perfis P2-C6, P2-65, P3-80, P5-148, P1-68, P1-132 e P6-152 (como descritos na tabela 1) foram encontrados dentre os 155 isolados de *S. cerevisiae* obtidos no presente estudo.

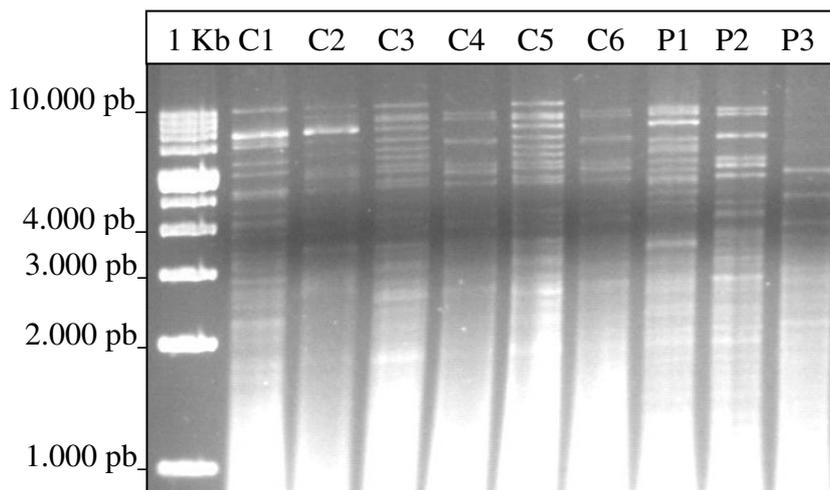


Figura 2 - Perfis de restrição do mtDNA das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* comerciais e indígenas. 1 Kb, padrão de peso molecular; C1, *S. cerevisiae* (var. *bayanus*) da marca PDM; C2, *S. cerevisiae* da marca Fermol Premier Cru; C3, *S. cerevisiae* da marca Ever Mycoferm Rouge; C4, *S. cerevisiae* da marca

Fermol Rouge; C5, *S. bayanus* da marca Ever Mycoferm Cru; C6, *S. cerevisiae* da marca Maurivin, AWRI 796; P1, levedura indígena 68; P2, levedura 65; P3, levedura indígena 80.

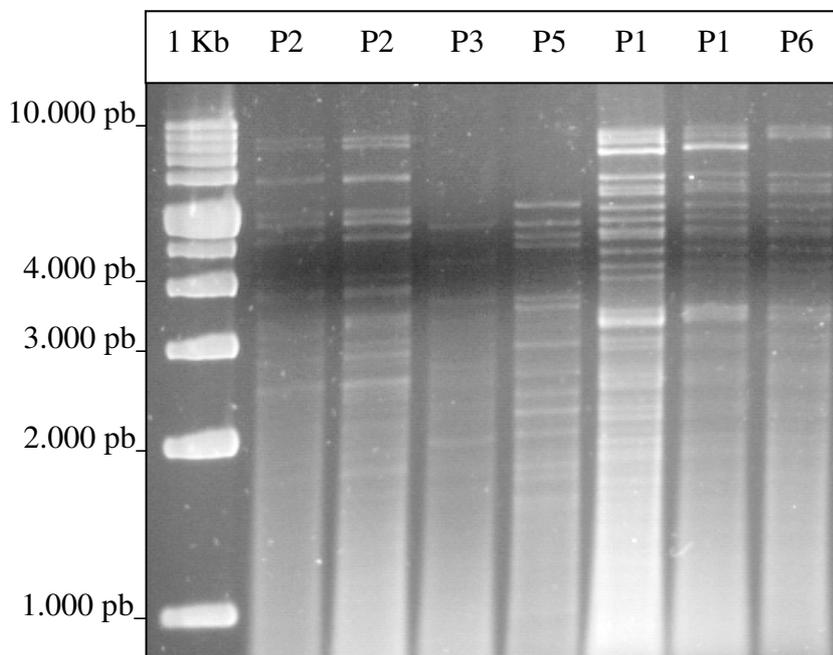


Figura 3 - Perfis de restrição do mtDNA encontrados nas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas dos mostos fermentados da uvas (*Vitis vinifera* L.). 1 Kb, padrão de peso molecular; P1, perfil 1 de restrição do mtDNA; P2, perfil 2 de restrição do mtDNA; P3, perfil 3 de restrição do mtDNA; P5, perfil 5 de restrição do mtDNA; P6, perfil 6 de restrição do mtDNA.

Tabela 1 – Descrição dos perfis de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

Código das linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	Variedade de uva isolada	Perfil das linhagens	Nº de isolados encontrados por perfil molecular
C6*	**	P2	64
65	Cabernet Sauvignon	P2	
80	Cabernet Sauvignon	P3	4
148	Sauvignon blanc	P5	5
68	Cabernet Sauvignon	P1	71
132	Tempranillo	P1	
152	Sauvignon blanc	P6	11

* *Saccharomyces cerevisiae* comercial - Maurivin, AWRI 796. ** Nenhuma

No presente trabalho, o tipo molecular prevalente dentre os isolados estudados (Figura 1) foi o perfil molecular P1 que representou 45,8% do total dos 155 isolados analisados, seguido do perfil P2 (41,3%), do P6 (7,1%), do P5 (3,2%) e do P3 (2,6%) (Figura 3). O perfil molecular P1 foi encontrado em todas as cinco cultivares de uvas estudadas (Grenache, Cabernet Sauvignon, Tempranillo, Sauvignon blanc e Verdejo), correspondendo assim a linhagem mais predominante (45,8%) entre as linhagens de *S. cerevisiae* isoladas da região do Vale do São Francisco. O perfil molecular P2 foi encontrado nas variedades de uva Grenache, Cabernet Sauvignon (em maior percentual) e Sauvignon blanc, correspondendo ao segundo perfil mais predominante (41,3%) entre os isolados. Este perfil molecular correspondeu à linhagem comercial AWRI 796 (C6): Estes resultados sugerem que a linhagem comercial AWRI 796 encontra-se espalhada nos vinhedos de onde foram isoladas. Uma explicação para isto é o descarte de restos de produção dos vinhos produzidos na região para que os nutrientes presentes retornem ao solo e sirvam como fertilizantes. As linhagens que possuem o perfil molecular P5 foram encontradas nas cultivares de uva Tempranillo e Sauvignon blanc e as do perfil molecular P3 apenas na cultivar Cabernet Sauvignon. Por meio deste método molecular de caracterização das linhagens de *S. cerevisiae* concluiu-se que apenas o perfil P2 não representa as linhagens selvagens da região.

Os resultados dos perfis moleculares apresentados na figura 2 indicaram que uma mesma linhagem é comercializada por diferentes companhias com nomes diferentes (linhagem comercial C4 possui o mesmo perfil molecular da C6) e que a linhagem comercial C3 designadas como *S. bayanus* apresenta o mesmo perfil mitocondrial da linhagem comercial C5 designada como *S. cerevisiae*. Estes resultados foram semelhantes aos observados por Fernández-Espinar et al (2001) quando estudaram o grau de parentesco de 45 linhagens comerciais de *S. cerevisiae*, utilizando a restrição do mtDNA combinada com a cariotipagem e PCR específico com o iniciador δ . Os autores encontraram um total de 30

linhagens diferentes e observaram que algumas destas linhagens comerciais apresentaram o mesmo perfil de bandas.

O conhecimento das linhagens selvagens de *S. cerevisiae* presentes nos vinhedos é fundamental para o conhecimento das populações de leveduras, principalmente *S. cerevisiae*, associadas com o processo de fabricação do vinho na região. De acordo com a técnica de restrição do DNA mitocondrial utilizada para a caracterização das linhagens indígenas de *S. cerevisiae*, isoladas do Vale do São Francisco, evidenciou quatro perfis moleculares diferentes entre elas (P1, P3, P5, P6) e um perfil molecular não indígena, perfil P2, no qual corresponde à linhagem comercial AWRI 796. Deste modo, esta técnica se fez útil para a contribuição na seleção de linhagens de *S. cerevisiae* regionais para a produção de vinhos típicos do Vale do São Francisco, Bahia, Brasil.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa de mestrado e auxílio financeiro, ao FINEP pelo apoio financeiro (projeto INOVASE) e à Fazenda Ouro Verde/Miolo (BA) pela doação das uvas e apoio científico.

REFERÊNCIAS

Ciani, M., Mannazzu, I., Marinangeli, P., Clementi, F., Martini, A., 2004. Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* 85, 159-164.

- Clemente-Jimenez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F.J., Rodríguez-Vico, F., 2005. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 301-308.
- Cappello, M.S., Bleve, G., Grieco, F., Dellaglio, F., Zacheo, G., 2004. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *J. Appl. Microbiol.* 97, 1274–1280.
- Demuyter, C., Lollier, M., Legras, J.-L., Le Jeune, C., 2004. Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery. *J. Appl. Microbiol.* 97, 1140–1148.
- Esteve-Zarzoso, B., Gostín-car, A., Bobet, R., Uruburu, F., Querol, A., 2000. Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the ‘El Penedès’ area (Spain). *Food Microbiol.* 17, 553-562.
- Fernández-Espinar, M. T., López, V., Ramón, D., Bartra, E., Querol, A., 2001. Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 1–10.
- Fleet, H., Heard, G. M., 1993. Yeasts: growth during fermentation. In: Fleet, .H. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp.27-55.
- Fleet, G.H., 2001. Wine. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food microbiology fundamentals and frontiers*, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC, pp.747-772.
- Frezier, V., Dubourdieu, D., 1992. Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 375–380.
- Gomes, F. C. O., 2006. Produção de cachaça artesanal utilizando linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* e por fermentação espontânea, com a caracterização

- química e sensorial da bebida e das bactérias do ácido lático associadas ao processo. Belo Horizonte: Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, 120p. (Tese de Doutorado).
- Gomes, F. C. O., Silva, C. L., Marini, M. M., Oliveira, E.S., Rosa, C.A., 2007. Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2438-2447.
- Guerra, J. B., Araújo, R. A. C., Pataro, C., Franco, G. R., Moreira, E. S. A., Mendonça-Hagler, L. C., Rosa, C. A., 2001. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 106-111.
- Kreger-Van Rij, N. J. W., 1984. *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., 2006. Yeast systematics and phylogeny - implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, The Yeast Handbook*, Rosa CA & Péter G (eds). Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 11-30.
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 4, 331- 371.
- Lehtonen, M., Jounela-Eriksson, P., 1983. Volatile and non-volatile compounds in the flavour of alcoholic beverages. In: PIGGOTT, J. R. *Flavour of distilled beverages: Origin and Development*. Florida: Verlag Chemie Internacional Inc., pp.64-78.
- Mortimer, R. K., Polsinelli, M., 1999. On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.* 150, 199-204.

- Oliveira, E. S., Cardello, H. M. A. B., Jeronimo, E. M., Souza, E. L. R., Serra, G. E., 2005. The influence of different yeasts on the fermentation, composition and sensory quality of cachaça. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 707-715.
- Pataro, C., Guerra, J. B, Petrillo-Peixoto, M. L, Mendonça-Hagler, L. C, Linardi, V. R, Rosa, C. A., 2000. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 88, 1-9.
- Polsinelli, M., Romano, P., Suzzi, G., Mortimer, R., 1996. Multiple strains of *Saccharomyces cerevisiae* on a single grape vine. *Lett. Appl. Microbiol.* 23, 110- 114.
- Pretorius, I. S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675–729.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramón, D., 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeasts strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2948-2953.
- Querol, A., Barrio, E., Ramón, D., 1994. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *Int J Food Microbiol.* 21, 315-323.
- Querol, A., Fleet, G. H. (Eds), 2006. *Yeasts in Food and Beverages*. Springer, Heidelberg, pp.453.
- Querol, A., Ramón, D., 1996. The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends Food Sci. Technol.* 7, 73-78.
- Rosini, G., 1984. Assessment of dominance of added yeast in wine fermentation and origin of *Saccharomyces cerevisiae* in wine-making. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 30, 249-256.
- Sabate, J., Cano, J., Querol, A., Guillamón, J. M., 1998. Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 452-455.

- Schuller, D., Alves, H., Dequin, S., Casal, M., 2005. Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde region of Portugal. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51, 167–177.
- Sniegowski, P. D., Dombrowski, P. G., Fingerman, E., 2002. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS Yeast Res.* 1, 306.
- Valero, E., Cambon, B., Schüller, D., Casal, M., Dequin, S., 2007. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Res.* 7, 317–329.
- Van Der Walt, J. P., Yarrow, D., 1984. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In: *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier Publishers B. V., Amsterdam, 45-104.
- Versavaud, A., Courcoux, P., Roulland, C., Dulau, L., Hallet, J., 1995. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3521-3529.
- Veizinhet, F., Hallet, J. N., Valade, M., Poulard, A., 1992. Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 83-86.
- Yarrow, D., 1998. Methods for isolation and identification of yeasts. In: Kurtzman, C. P., Fell, J. W. *The yeasts, a taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam, 77-100.

CAPÍTULO 3

**PRODUÇÃO DE VINHOS UTILIZANDO LINHAGENS SELECIONADAS DE
Saccharomyces cerevisiae ISOLADAS NA REGIÃO DO VALE DO SÃO FRANCISCO,
BAHIA, BRASIL**

FOOD MICROBIOLOGY

PRODUÇÃO DE VINHOS UTILIZANDO LINHAGENS SELECIONADAS DE
Saccharomyces cerevisiae ISOLADAS NA REGIÃO DO VALE DO SÃO FRANCISCO,
BAHIA, BRASIL

CAMILA M. P. B. S. DE PONZZES ^a *, DÂNGELLY L. F. M. DE MÉLO ^a, CAROLINE A.
SANTANA ^a, GIULIANO E. PEREIRA ^b, MICHELLE O. C. DE MENDONÇA ^c, FÁTIMA
C. O. GOMES ^d, EVELYN S. OLIVEIRA ^e, RITA C. TRINDADE ^a, CARLOS A. ROSA ^c

^a Laboratório de Microbiologia Aplicada, Departamento de Morfologia - Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon, s/n, Jd Rosa Else. CEP: 49.100-000 - São Cristóvão, SE - Brasil

^b Pesquisador Embrapa Uva e Vinho/Semi-Árido BR 428, Km 152, Zona Rural - Caixa Postal 23 - CEP 56302-970 - Petrolina, PE - Brasil

^c Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras / Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha - C.P. 486 - CEP 31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil

^d Departamento de Química, Centro Federal de Ensino Tecnológico, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

^e Laboratório de Microbiologia de Alimentos / Departamento de Alimentos – Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Minas Gerais Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha - Belo Horizonte, MG - Brasil

* Corresponding author

Tel.: 55 079 21056628

E-mail address: camiladeponzzes@hotmail.com

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi produzir vinhos a partir de uvas da cultivar Cabernet Sauvignon utilizando linhagens indígenas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas na região do Vale do São Francisco. As características físico-químicas e a presença das linhagens selecionadas de *S. cerevisiae* durante as fermentações foram determinadas. A presença das linhagens de *S. cerevisiae* foi avaliada pela análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA mitocondrial (RFLP-mtDNA) das linhagens, ao final da fermentação alcoólica e malolática. Testes em meios sintéticos foram realizados para selecionar as melhores linhagens indígenas (80, 148, 68 e 152) em relação aos parâmetros cinéticos de fermentação. Duas linhagens, 68 e 152, foram escolhidas para os testes em escala piloto de produção de vinho. Os vinhos foram produzidos com estas linhagens indígenas e uma levedura controle (linhagem comercial, Maurivin - AWRI 796). As análises físico-químicas dos três vinhos foram semelhantes. A análise dos perfis de restrição do mtDNA mostrou que a linhagem iniciadora 152 predominou ao final da fermentação alcoólica e malolática. No entanto, linhagem 68 não conseguiu prevalecer no experimento de produção do vinho. Os resultados sugerem que a linhagem indígena 152 poderia ser utilizada na produção de vinhos típicos no Vale do São Francisco.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, leveduras indígenas, linhagens selecionadas, vinhos, parâmetros físico-químicos, RFLP-mtDNA, *Vitis vinifera* L., Cabernet Sauvignon

1 INTRODUÇÃO

O vinho é uma bebida alcoólica fermentada, obtido genericamente pela fermentação alcoólica de um suco de fruta natural madura (mosto), por ação de leveduras que convertem o açúcar em álcool etílico e gás carbônico, produzindo também compostos secundários responsáveis em grande parte pelo aroma e sabor da bebida (Corazza, 2001; Ribéreau-Gayon et al., 2006; Tosetto & Andrietta, 2003; Blasi, 2004; Jackson, 2009). Na vinificação, ao final da fermentação alcoólica inicia-se a fermentação malolática. Nesta fase da fermentação as bactérias ácido-láticas agem transformando o ácido málico presente em ácido lático. O ácido málico é o responsável no vinho pelo excesso de acidez e gosto áspero, portanto agressivo ao paladar, entretanto o ácido lático é mais suave e aveludado, tornando assim o vinho mais agradável. As principais características desta fermentação são a diminuição da acidez, o aumento do pH, influência na estabilidade microbiana e afeta atributos sensoriais do vinho (Jackson, 2008; Santos 2008). Os vinhos que apresentam teores alcoólicos de 8,6% a 14% em volume são classificados como vinho de mesa e aqueles produzidos com uvas das variedades de *Vitis vinifera* L. são chamados de vinho de mesa fino (Brasil, 2004).

No processo de vinificação, além do álcool etílico e do gás carbônico, formam-se outras substâncias, em menor volume, que influenciam as características organolépticas do vinho. Contudo a quantidade e a qualidade dessas substâncias dependem do tipo de uva, da levedura e das condições de fermentação (Santos, 2008). O metabolismo das leveduras influencia a composição final da bebida, sendo diferente para cada linhagem (Clemente-Jimenez et al., 2005; Oliveira et al. 2005; Querol & Fleet, 2006; Gomes, 2006). Segundo Santos (2008), quase quinhentas substâncias químicas naturais podem ser identificadas no vinho.

A produção de vinhos na região do Vale do São Francisco já abrange um mercado consumidor interno fixo além de exportar para grandes países consumidores. As uvas desta região são cultivadas entre os paralelos 8° e 9° da latitude Sul, as mais baixas na viticultura mundial. A altitude média é de 400 metros, situada na caatinga do sertão nordestino, em áreas planas e às margens do rio São Francisco (Santos, 2008). Esta região destaca-se como a principal região vitivinícola de clima tropical do planeta. Por ser uma região nova em relação à produção de vinhos, possui muitos aspectos tecnológicos a serem melhores compreendidos (Guerra & Zanús, 2004). Estes vinhos são produzidos com leveduras importadas. Como consequência, existe um grande interesse das fazendas vitiviníferas em produzir os vinhos com leveduras típicas da região e a espécie de levedura mais utilizada na vinificação como iniciadora é a espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

Estudos visando melhorias na qualidade dos vinhos utilizam linhagens indígenas de *S. cerevisiae* para poder dar às bebidas características próprias da região, procurando conhecer a contribuição destas linhagens para a qualidade dos vinhos (Regodón et al., 1997; Esteve-Zarzoso, 2000; Guimarães, 2005; Lopes, 2007; Fleet, 2008). As leveduras indígenas, por já estarem aclimatadas às condições ambientais, poderiam ser mais competitivas do que as leveduras comerciais, por isso poderiam dominar a fermentação e assegurar a manutenção das propriedades sensoriais típicas dos vinhos produzidos na região determinada (Regodón et al., 1997). De acordo com González-Perez et al. (1993), estas culturas estão sendo produzidas em diferentes regiões na forma de leveduras secas ativas e fornecidas aos produtores para serem utilizadas no mosto como leveduras iniciadoras. Para que linhagens indígenas típicas de cada região sejam selecionadas, é necessário estudos da diversidade e ecologia das leveduras presentes no ambiente do vinhedo e de fermentação dos vinhos (Rosini, 1984; Polsinelli et al., 1996; Esteve-Zarzoso, 2000; Lopes, 2002; Cappello et al., 2004; Ciani et al., 2004; Demuyter et al., 2004; Schuller et al., 2005; Valero et al., 2007; Lopes, 2007).

O uso de linhagens selecionadas favorece o início mais rápido do processo fermentativo. Com isto, os riscos de contaminação apresentados pela fermentação espontânea podem ser evitados, favorecendo menor competição por nutrientes essenciais, maior rendimento e qualidade do produto resultante (Fleet, Lafon-Lafourcade & Ribéreau-Gayon, 1984; Sanni & Lonner, 1993). As culturas iniciadoras conseguem dominar o processo fermentativo porque são adicionadas em altas concentrações, prevalecendo sobre a microbiota indígena. No entanto, estudos mostram que a microbiota transiente tem uma participação importante no processo (Barros Lopes et al., 1996).

Os vitivicultores buscam utilizar linhagens iniciadoras com características fermentativas adequadas. Algumas destas características são: rápida velocidade no início do processo fermentativo, resistência ao elevado nível de etanol, osmotolerância, alta estabilidade genética, reduzida formação de espuma, produção de baixos níveis de sulfeto de hidrogênio, tolerância ao dióxido de enxofre, eficiência na habilidade de fermentar açúcares em concentrações em torno de 20% (p/v) e produzir quantidades adequadas de glicerol (Pretorius, 2000; Carrasco & Querol, 2001).

Além de selecionar linhagens de *S. cerevisiae* por meio das características fisiológicas, químicas e cinéticas, tem-se usado ferramentas da biologia molecular (Polsinelli et al., 1996; Sniegowski et al., 2002; Demuyter et al., 2004; Cappello et al., 2004; Valero et al., 2007; Lopandic et al., 2008). Uma das ferramentas mais utilizadas é a restrição do DNA mitocondrial (RFLP-mtDNA), que possibilita diferenciar tipos moleculares desta espécie (Frezier & Dubourdieu, 1992; Querol & Ramón, 1996; Esteve-Zarzoso et al., 2000; Fernández-Espinar et al., 2001; Schuller et al., 2005; Gomes et al., 2007; Lopes et al., 2007). O objetivo deste trabalho foi produzir vinhos em escala piloto utilizando uvas da cultivar Cabernet Sauvignon com linhagens de *S. cerevisiae* isoladas e selecionadas da região do Vale

do São Francisco, analisando as características físico-químicas dos vinhos, além de avaliar a presença destas linhagens selecionadas ao final da fermentação alcoólica e malolática.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Linhagens de Leveduras

Foram utilizadas seis linhagens (tabela 1) de *S. cerevisiae*: quatro linhagens selvagens diferentes (68, 80, 148 e 152), uma linhagem comercial (Maurivin, AWRI 796) e a linhagem 65 (igual à linhagem comercial Maurivin - AWRI 796, sendo, no entanto isolada da uva – ver capítulo 2. As leveduras isoladas da uva pertencem ao banco de linhagens do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Sergipe. As linhagens foram isoladas de variedades de uva (*Vitis vinifera* L.) coletas na Fazenda Ouro Verde/Miolo, Vale do São Francisco, município de Casa Nova, Bahia, Brasil.

Tabela 1 – Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas nos experimentos de fermentação em meio sintético.

Código das Linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	Variedade de Uva Isolada
Maurivin - AWRI 796 ^{1,2}	*
65 ²	Cabernet Sauvignon (tinta)
80 ³	Cabernet Sauvignon (tinta)
148 ³	Sauvignon blanc (branca)
68 ³	Cabernet Sauvignon (tinta)
152 ³	Sauvignon blanc (branca)

¹ *Saccharomyces cerevisiae* comercial - Maurivin, AWRI 796; ² Linhagens iguais de *S. cerevisiae*

³ Linhagens indígenas de *S. cerevisiae*

*Indeterminada

2.2 *Parâmetros cinéticos fermentativos*

2.2.1 *Padronização do inóculo*

A massa seca de 0,4 g/100 mL de cada linhagem foi determinada antes dos experimentos de fermentação. O método utilizado foi o de secagem até peso constante conforme descrito por Andrietta et al. (1995). Para determinação da massa seca, cada uma das linhagens utilizada foi previamente crescida em meio sintético contendo 100 mL de meio (glicose 40g/L, fosfato diácido de potássio 5,0 g/L, cloreto de amônio 1,5 g/L, sulfato de magnésio heptahidratado 1,0 g/L, cloreto de potássio 1,0 g/L, extrato de levedura 6,0 g/L). Os frascos foram incubados em agitador (modelo MA-830) à temperatura de 27°C a 150 rpm por 24h. Após este período, as amostras de 100 mL do cultivo foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento (massa úmida) lavado com água destilada estéril e centrifugado novamente. A massa celular úmida foi transferida para uma placa de Petri e colocada em estufa à 45-50 °C por 24h para determinar a massa celular seca correspondente.

2.2.2 *Experimentos de fermentação*

Os testes dos parâmetros cinéticos foram adaptados de acordo com a metodologia descrita por Silva et al. (2006). Estes experimentos foram úteis para selecionar as melhores linhagens para a produção dos vinhos. Os isolados foram previamente ativados em agar YM (glicose 1%, extrato de malte 0,3%, extrato de levedura 0,3%, peptona 0,5% e ágar 2%) por 48h à 25°C. Posteriormente foram crescidos em 100 mL de meio de cultivo (glicose 40 g/L, fosfato diácido de potássio 5,0 g/L, cloreto de amônio 1,5 g/L, sulfato de magnésio

heptahidratado 1,0 g/L, cloreto de potássio 1,0 g/L, extrato de levedura 6,0 g/L), em triplicata, e incubados em agitador horizontal (modelo MA-830) à temperatura de 27°C, a 150 rpm, por 24 horas *overnight*. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado com água destilada estéril e centrifugado novamente. Antes de iniciar as fermentações, a massa úmida centrifugada de cada isolado foi pesada, dentro da capela de fluxo laminar, para chegar ao valor de 0,4 g/100 mL de massa seca para realizar o ensaio da fermentação. Os frascos utilizados para realização das fermentações foram previamente pesados vazios, pesados com o meio de cultivo, e anotado os respectivos pesos. Um volume de 50 mL do mesmo meio de cultivo utilizado para os experimentos de fermentação, antes da inoculação da levedura, foi separado e congelado à -20 °C para análises posteriores.

As fermentações foram conduzidas em triplicata, contendo nos frascos Erlenmeyer a massa úmida de cada isolado (tabela 2), em 100 mL de meio de cultivo (glicose 150 g/L, fosfato diácido de potássio 5,0 g/L, cloreto de amônio 1,5 g/L, sulfato de magnésio heptahidratado 1,0 g/L, cloreto de potássio 1,0 g/L, extrato de levedura 6,0 g/L). Os frascos foram pesados (frasco + meio de cultivo + massa úmida) e incubados em agitador horizontal (modelo MA-830) à temperatura de 27°C, a 150 rpm. Os frascos foram pesados em intervalos de 1 hora para obtenção do balanço de massa e cinética de liberação de CO₂ da fermentação (Silva et al. 2006). Depois que as amostras atingiram o peso estabelecido (quando a diferença de pesos da amostra foi $\leq 0,09$ g no intervalo de 1 hora), estas foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi armazenado em tubos Falcon estéreis e congelado à -20°C para as análises posteriores. A massa celular retida nos tubos de Falcon foi lavada com água destilada estéril e centrifugada novamente, em seguida transferida para estufa a 45-50 °C até atingir peso constante para a determinação da massa celular seca final. No sobrenadante foram determinados os teores finais de etanol, açúcares redutores

totais (ART) pela metodologia do DNS desenvolvida por Miller (1959), acidez total titulável (ABNT 1997a) e expressa em ácido acético, pH (determinada com auxílio de pHmetro), densidade e glicerol utilizando o Kit para triglicerídeos (LABORLAB-Guarulhos, SP; de acordo com as instruções do fabricante). Para a determinação do etanol, o sobrenadante foi previamente destilado por arraste de vapor, em microdestilador de álcool (Tecnal, Modelo Te-012) e determinado espectrofotometricamente pelo método do dicromato de potássio (ABNT, 1997b). Como controle, as concentrações iniciais de Açúcar Redutor Total (ART), a densidade, a acidez, glicerol, etanol e o pH, pelo método potenciométrico, foram determinadas na amostra congelada de 50 mL de meio de cultura (sem inóculo de levedura adicionado).

2.2.3 Cálculos dos parâmetros de fermentação

Com os dados das análises acima descritas, calculou-se os parâmetros de fermentação de acordo com Oliveira et al. (2004). Estes parâmetros foram o fator de conversão de substrato em célula ($Y_{x/s}$), fator de conversão do substrato em etanol ($Y_{p/s}$) e produtividade ($g L^{-1} h^{-1}$).

2.3 Produção de vinhos

As linhagens de *S. cerevisiae* foram selecionadas para a produção de vinhos levando-se em conta os parâmetros cinéticos de fermentação. Os vinhos foram feitos em triplicata para cada linhagem selecionada, além da linhagem comercial Maurivin - AWRI 796.

As uvas (*V. vinifera* L.) da variedade Cabernet Sauvignon (tinta) foram colhidas na Fazenda Ouro Verde/Miolo (Casa Nova-BA) no mês de Setembro/2009, pela manhã, e

processadas no dia seguinte. Aproximadamente 20 kg de uva foram colhidas, para cada vinho, para produzir um volume final de 9 L de vinho. Os vinhos foram produzidos no laboratório de enologia da EMBRAPA Semi-Árido (Petrolina-PE). Para evitar a oxidação e crescimento de microrganismos indesejáveis nos vinhos foi realizado a sulfitação, com o acréscimo de 0,9 g de metabissulfito de potássio. A massa úmida das linhagens de *S. cerevisiae* inoculadas, 13 g em 9 L de vinho, foi correspondente à massa seca (desidratada) adicionada de 1,8 g/9 L da levedura comercial Maurivin - AWRI 796, utilizada na produção dos vinhos na EMBRAPA Semi-Árido.

2.4 Análises físico-químicas dos vinhos

As análises do pH, densidade, acidez total (expresso em % de ácido tartárico), acidez volátil (expresso em g/L de ácido acético), álcool (expresso em °GL) foram realizadas de acordo com a Portaria nº76 do Ministério da Agricultura (1986). Para realizar as análises do glicerol (expresso em g/L) foi utilizado o Kit para triglicerídeos (LABORLAB-Guarulhos, SP; de acordo com as instruções do fabricante); e para açúcares redutores totais (ART), foi utilizada a metodologia do DNS (Miller 1959), expresso em g/L.

2.5 Análise estatística

Os resultados das dosagens dos parâmetros cinéticos da fermentação em meio sintético e nos vinhos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas com o teste Scott e Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa Sisvar (versão 5.0).

*2.6 Avaliação da presença das linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* ao final da fermentação alcoólica e fermentação malolática*

Para saber se as leveduras inoculadas no experimento conseguiram permanecer até o final do processo fermentativo, foi realizado o isolamento das leveduras presentes no mosto do vinho em duas etapas: antes da prensagem (separação da parte sólida da líquida no vinho), etapa que antecede o final da fermentação alcoólica, e no final da fermentação malolática (etapa que durou aproximadamente 30 dias).

2.6.1 Isolamento das linhagens nos vinhos

O isolamento, em triplicata, foi feito em meio agar YM, acrescidos de 0,001% de cloranfenicol, nas diluições de 10^{-4} e 10^{-6} (final da fermentação alcoólica) e nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} (final da fermentação malolática). Dez isolados do morfotipo de levedura predominante foram isolados, quando possível, das placas que apresentaram o melhor isolamento. Além destes, pelo menos um isolado dos morfotipos diferentes foram coletados. Os isolados obtidos foram comparados com os perfis de mtDNA previamente conhecidos das linhagens de *S. cerevisiae* 68 e 152, utilizadas como iniciadoras do processo fermentativo.

2.6.2 Caracterização molecular pela restrição do DNA mitocondrial (RFLP-mtDNA)

A análise de restrição do DNA mitocondrial (RFLP-mtDNA) dos isolados de *S. cerevisiae* foi realizada de acordo com os protocolos descritos por Querol e colaboradores (1992; 1994).

Obtenção do DNA mitocondrial

Para a extração de DNA mitocondrial, as células foram crescidas em meio agar YM por 24-48 h, à temperatura de 25°C. Posteriormente, os isolados foram crescidos em caldo YEPD (1% de extrato de levedura; 2% de peptona; 1% de glicose) por 18 horas a 150 rpm, a 25°C. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente, e em seguida lavadas com água destilada estéril e centrifugadas novamente. O sedimento foi ressuscitado em 500 µL de solução de enzima lítica de *Rhizoctonia solani* (25mg/mL diluída em 1M sorbitol, 0,1M EDTA, pH 7,5) e incubado a 45°C por 2 horas, agitando a cada 30 minutos com delicadeza. Passado o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, em seguida foi descartado o sobrenadante. O sedimento foi ressuscitado em 500 µL de Tris-HCl 1M e EDTA 0,5 mM pH 7,4 e adicionado 13 µL de SDS 10%, e incubado a 65°C por 5 minutos. Em seguida as amostras foram colocadas em gelo, e adicionou-se 200 µL de acetato de potássio 5 M gelado, por 10 minutos. Após este procedimento, as células foram centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi recuperado, sendo adicionado 700 µL de isopropanol e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esta incubação, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado, o DNA lavado com 500 µL de etanol 70%, e centrifugado por 5 minutos a 14000 rpm. Depois da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o DNA foi deixado à temperatura ambiente *overnight* para evaporação do que sobrou de etanol. Quando todo o etanol foi evaporado do DNA, a re-hidratação foi realizada com 30 µL de água ultra pura estéril e a amostra foi congelada. A quantidade de DNA foi dosada em aparelho de NanoDrop (NanoDrop Technologies), antes da realização dos experimentos.

Digestão do DNA mitocondrial

A digestão foi realizada, segundo instrução do fabricante, utilizando-se 10 µL do DNA mitocondrial acrescido de 10 µL de uma solução composta por 10% da enzima de restrição *Hinf* I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 20% do tampão da enzima de restrição, 10% de RNase e 60% de água ultra pura estéril, à temperatura de 37°C por 6 h. Após a digestão, o corante GelRed foi diluído diretamente nas amostras e no marcador molecular (1kb). Os produtos da digestão foram separados e analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (100 V por 150 minutos) em TBE 0,5X, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados utilizando sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat, França).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise dos parâmetros cinéticos da fermentação

Os resultados das dosagens dos parâmetros cinéticos de fermentação realizados para selecionar as linhagens para os experimentos de produção dos vinhos são mostrados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Dosagens dos parâmetros cinéticos da fermentação - densidade, Acidez Total Titulável (ATT), pH, Açúcar Redutor Total (ART), massa úmida, massa seca e glicerol - no meio de cultivo antes (inicial) e após (final) a inoculação das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*; dosagens da produção de etanol e tempo de fermentação também constam na tabela. Os valores para desvio-padrão estão indicados ao lado das dosagens.

<i>S. cerevisiae</i>	68	152	80	148	Maurivin - AWRI 796	65
Densidade						
Inicial (g/L)	1055±0,907 <i>b</i>	10564±0,472 <i>b</i>	10493±1,804 <i>a</i>	10493±1,804 <i>a</i>	10559±1,007 <i>b</i>	10559±1,007 <i>b</i>
Densidade						
Final (g/L)	986,8± 0,346 <i>a</i>	988,3±1,234 <i>a</i>	990,8± 1,106 <i>b</i>	1018,1±1,323 <i>c</i>	988,3±2,654 <i>a</i>	991,6±2,970 <i>b</i>
ATT Inicial						
(g/L)	3,26±0,148 <i>b</i>	3,285±0,226 <i>b</i>	2,914±0,043 <i>a</i>	2,914±0,043 <i>a</i>	4,051±0,043 <i>c</i>	4,051±0,043 <i>c</i>
ATT Final						
(g/L)	4,288±0,148 <i>b</i>	5,36± 0,043 <i>c</i>	3,903±0,113 <i>a</i>	4,199± 0,214 <i>b</i>	5,187±0,159 <i>c</i>	5,508±0,154 <i>c</i>
pH Inicial	4, 8667±0,042 <i>a</i>	5,0733±0,107 <i>b</i>	5,3455±0,047 <i>c</i>	5,3455±0,047 <i>c</i>	5,0333±0,042 <i>b</i>	5,0333±0,042 <i>b</i>
pH Final	2,8833± 0,076 <i>a</i>	3,3533±0,046 <i>b</i>	3,35±0,07 <i>b</i>	4,0067±0,080 <i>c</i>	2,7867±0,057 <i>a</i>	2,81±0,080 <i>a</i>
ART Inicial						
(g/L)	139,727±0,923 <i>b</i>	139,729±0,921 <i>b</i>	131,003±0,553 <i>a</i>	131,003±0,553 <i>a</i>	131,003±0,553 <i>a</i>	131,003±0,553 <i>a</i>
ART Final						
(g/L)	2,2132±0,61 <i>a</i>	2,4047±0,048 <i>a</i>	1,6544±0,128 <i>a</i>	68,6356±2,753 <i>b</i>	1,9258±0,037 <i>a</i>	2,0109±0,119 <i>a</i>
Massa Úmida						
Inicial (g/L)	23,2	22,7	25,4	26	27,7	29,2
Massa Úmida						
Final (g/L)	72,9±3,061 <i>b</i>	72,5±0,264 <i>b</i>	78,233±9,504 <i>b</i>	32,733±0,808 <i>a</i>	69,633±0,058 <i>b</i>	70±1,053 <i>b</i>
Massa Seca						
Inicial (g/L)	4	4	4	4	4	4
Massa Seca						
Final (g/L)	8,485±0,250 <i>b</i>	8,43±0,849 <i>b</i>	8,762±0,514 <i>b</i>	5,513±0,592 <i>a</i>	11,449±0,263 <i>c</i>	11,14±0,482 <i>c</i>
Glicerol Inicial						
(g/L)	0,1673±0,007 <i>a</i>	0,3636±0,070 <i>b</i>	0,6691±0,085 <i>c</i>	0,6691±0,085 <i>c</i>	0,16±0,022 <i>a</i>	0,16±0,022 <i>a</i>
Glicerol Final						
(g/L)	13,2436±1,171 <i>c</i>	8,9964±1,902 <i>b</i>	11,9564±1,412 <i>c</i>	10,2473±0,779 <i>b</i>	4,7345±2,045 <i>a</i>	2,7273±0,353 <i>a</i>
Etanol (g/L)	40.13±2,825 <i>b</i>	41.91±5,595 <i>b</i>	39.61±0,586 <i>b</i>	20.64±1,245 <i>a</i>	43.56±11,057 <i>b</i>	46.39±2,8 <i>b</i>
Tempo de Fermentação						
(h)	18,67±2,309 <i>b</i>	17,33±1,155 <i>b</i>	41±1,000 <i>d</i>	22 <i>c</i>	11 <i>a</i>	11 <i>a</i>

* As médias com os seus desvios padrões seguidas pela mesma letra (*a, b, c, d*) na horizontal não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste Scott e Knott ao nível de 5% de significância.

** ATT: Acidez Total Titulável (expressa em ácido acético).

De acordo com a tabela 2 os resultados da linhagem comercial e 65 foram estatisticamente iguais, pois a segunda é um isolado desta mesma linhagem comercial, mas obtido do mosto naturalmente fermentado das uvas (ver capítulo 2). Os valores finais da acidez variaram de 3,903 a 5,508 g/L; os valores finais de pH variaram de 2,7867 a 4,0067 no final da fermentação. Os valores das densidades, variando de 986,8 a 1018,1 g/L, diminuíram em relação ao meio sem inóculo. Esta diminuição era esperada já que a densidade constitui uma medida aproximada da quantidade do açúcar contido no meio. Assim, conforme o açúcar é consumido e o álcool é formado, a densidade diminui. A densidade final da linhagem 148 foi alta, 1018,1g/L, mostrando que esta consumiu menos açúcar do que as outras linhagens testadas. Também para esta linhagem o valor de ART final foi alto, 68,6356g/L, muito acima das outras linhagens. Os resultados das dosagens do ART final das linhagens diminuíram com relação às dosagens iniciais, pois com a quebra da glicose há liberação de CO₂ e álcool, assim diminuindo a quantidade de açúcares do meio. A produção de etanol por cada linhagem foi estatisticamente igual. Os valores finais da massa úmida e seca da linhagem 148 foram baixos, de 32,733 g/L e 5,513 g/L, respectivamente. Os tempos de fermentação das linhagens 68 e 152 foram iguais estatisticamente. Já o tempo para completar a fermentação da linhagem 80 foi muito longo, 41h, em relação a outras linhagens testadas; as linhagens Maurivin e 65 fermentaram mais rapidamente o meio de cultivo (11h). Os valores finais do glicerol variaram de 2,7273g/L a 13,2436g/L no final da fermentação. O glicerol é um subproduto da fermentação alcoólica que produz nos vinhos um sabor adocicado semelhante à glicose, no entanto, na presença de outros constituintes do vinho a doçura do glicerol é praticamente imperceptível (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

A partir dos resultados obtidos, as linhagens de *S. cerevisiae* 68 e 152 foram selecionadas para a produção de vinho em escala piloto. Além destas linhagens, a linhagem

comercial Maurivin foi utilizada nestes experimentos, como controle, pois é a levedura mais utilizada na produção dos vinhos Cabernet Sauvignon na região. A linhagem 148 não foi utilizada porque demorou 22 h para fermentar em escala de bancada, tempo superior ao das linhagens 68, 152, Maurivin e 65; além disto, a quantidade de ART final foi alta, 68, 6356g/L, e o valor de massa úmida obtido no final no processo de fermentação, 32,733g/L, foi baixo. Já a linhagem 80 também não foi utilizada no processo de produção do vinho por ter possuído o maior tempo de fermentação, que foi de 41h.

Os valores da tabela 3 mostram que, estatisticamente, os rendimentos em etanol das linhagens foram iguais; o rendimento em massa seca e produtividade das linhagens Maurivin e 65 foram iguais estatisticamente entre elas, e melhores que as das outras linhagens, que foram estatisticamente iguais entre si. Os resultados mostraram que a linhagem comercial Maurivin, nos parâmetros de rendimento em etanol, em massa seca e produtividade, foi melhor que as linhagens indígenas.

Tabela 3. Comparação entre as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* estudadas com relação ao rendimento em etanol ($Y_{p/s}$), rendimento em massa seca ($Y_{x/s}$) e produtividade (P). Os valores para desvio-padrão estão indicados ao lado das dosagens.

<i>S. cerevisiae</i>	Maurivin -					
	68	152	80	148	AWRI 796	65
$Y_{p/s}$	0,252±0,100 a	0,143±0,180 a	0,348±0,080 a	0,382±0,255 a	0,304±0,134 a	0,32±0,007 a
$Y_{x/s}$	0,033±0,002 a	0,032±0,006 a	0,037±0,0039 a	0,024±0,0098 a	0,058±0,002 b	0,055±0,004 b
P (g/L .h)	1,860±0,905 a	1,131±1,366 a	1,099±0,261 a	1,084±0,767 a	3,568±1,564 b	3,750±0,077 b

* As médias com os seus desvios padrões seguidas pela mesma letra (a, b) na horizontal não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste Scott e Knott ao nível de 5% de significância.

3.2 Análises das características físico-químicas dos vinhos

Os valores iniciais do pH, dos Sólidos Solúveis Totais (SST) e da Acidez total (expresso em ácido tartárico) das uvas e do mosto, no momento da colheita da cultivar Cabernet Sauvignon, encontram-se na tabela 4. As análises das características físico-químicas realizadas (pH, densidade, álcool, acidez total, acidez volátil, açúcar redutor total e glicerol) nos três vinhos produzidos pelas diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (linhagens comercial Maurivin - AWRI 796, linhagem indígena 68 e linhagem indígena 152) encontram-se na tabela 5. Os testes sensoriais destes vinhos encontram-se ainda em fase de análise na Embrapa Uva e Vinho (Bento Gonçalves, RS).

Tabela 4. Análises do pH, Sólidos Solúveis Totais (SST) e acidez total das amostras de uva e do mosto no momento da colheita uva da cultivar Cabernet Sauvignon.

Colheita da uva	pH	SST (°Brix)	Acidez Total (g/L de ácido tartárico)
Características da uva	3,38	21,2	6,9
Características do mosto	3,27	21,2	9

*SST: em °Brix.

Tabela 5. Análises físico-químicas dos vinhos produzidos com as linhagens indígenas de *Saccharomyces cerevisiae* (68 e 152) e a linhagem comercial Maurivin - AWRI 796. Os valores para desvio-padrão estão indicados ao lado das dosagens.

Vinhos	pH	Densidade (g/L)	Álcool (°GL)	Acidez Total (g/L de ácido tartárico)	Acidez Volátil (g/L de ácido acético)	Açúcar Redutor Total-ART (g/L)	Glicerol (g/L)
Linhagem Comercial Maurivin - AWRI 796	3,3	995,9±0 c	12,08±0,006a	7,16±0,06 a	0,29±0 b	6,192±0,14b	13,04±0,51b
<i>S. cerevisiae</i> 68	3,3	995,3±0,01 b	12,03± 0,06a	7,23±0,06 a	0,23±0,006 a	4,211±0,13a	8,33±0,16a
<i>S. cerevisiae</i> 152	3,4	995,1±0,1 a	12,1±0,0056a	7,23±0,06 a	0,23±0,01 a	7,679±0,16c	9,19±1,51a

* As médias com os seus desvios padrões seguidas pela mesma letra (a, b, c) na horizontal não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste Scott e Knott ao nível de 5% de significância.

O vinho produzido com a levedura comercial Maurivin – AWRI 796 serviu como controle para comparação com os vinhos produzidos com as outras duas leveduras indígenas. O valor encontrado do pH nos vinhos produzidos com a linhagem 68 e a linhagem comercial foi de 3,3, sendo um valor próximo obtido no vinho produzido com a linhagem 152 (3,4). Estes valores estão de acordo com a legislação brasileira que indica que o pH do vinho pode variar de 3,0 a 4,0 dependendo do tipo de cultivar de uva e safra. O pH ácido dá aos vinhos uma resistência à contaminação bacteriana. As densidades dos três vinhos produzidos pela *Saccharomyces cerevisiae* comercial (995,9 g/L), *S. cerevisiae* 68 (995,3 g/L) e *S. cerevisiae* 152 (995,1 g/L) foram estatisticamente diferentes. De acordo com Brasil (2004), os teores alcoólicos encontrados estão na concentração estabelecida pela legislação brasileira para serem designados como vinhos, já que estes variaram de 12,08 a 12,1°GL. Os valores da acidez total, expresso em ácido tartárico, foram iguais estatisticamente para os três vinhos. Esta acidez conserva e reforça os compostos aromáticos no vinho (Blasi, 2004). Os teores de acidez volátil foram estatisticamente iguais para os vinhos produzidos com as linhagens indígenas de *Saccharomyces cerevisiae* 68 e 152 no valor de 0,23 g/L de ácido acético e estatisticamente diferente com o vinho produzido com a linhagem comercial, 0,29 g/L de

ácido acético. Esta acidez volátil elevada, com relação aos outros vinhos, de 0,29 g/L pode ser justificada pela quantidade de glicerol produzida pelo mesmo vinho (13,04 g/L). Um das funções do glicerol a ser produzido é para manter o equilíbrio redox favorável, assim quando há excesso de NAD^+ gerados na síntese do glicerol estes podem ser utilizados na oxidação do acetaldeído a ácido acético e com isso aumenta a acidez volátil do vinho (Jackson, 2008). Os valores encontrados da acidez volátil nos três vinhos indicam uma boa sanidade e qualidade dos mesmos, pois valores elevados de acidez volátil podem indicar a presença de bactérias deterioradoras. Os valores do açúcar redutor total (ART) dos vinhos foram estatisticamente diferentes e corresponderam a 6,192 g/L (vinho produzido pela linhagem comercial), 4,211 g/L (vinho produzido pela linhagem 68) e 7,679 (vinho produzido pela linhagem 152). Estes valores correspondem aos açúcares que não foram quebrados para a formação do etanol, assim, conseqüentemente, caso os vinhos venham a serem envelhecidos posteriormente, podem no final reagir com outros composto e sofrer rearranjo estrutural, com isso podendo afetar na doçura perceptível do vinho, entretanto essas reações não parecem ocorrer em grau suficiente para afetar (Jackson, 2008). Os vinhos produzidos com a linhagem 68 e linhagem 152 apresentaram resultados estatisticamente iguais nos valores do glicerol, 8,33 g/L e 9,19 g/L, respectivamente. Já o vinho produzido com a linhagem comercial apresentou um valor mais elevado e estatisticamente diferente dos outros, 13,04 g/L. A via de formação de glicerol é a mesma da formação do etanol, assim, o açúcar que é desviado para a formação de glicerol deixa de ser quebrado para a formação do etanol (Tosetto & Andrietta, 2003; Guimarães, 2005). O glicerol no vinho influencia no balanço redox, nas características sensoriais como reforço no aparente sabor de doçura, assim como o teor de etanol (Jackson, 2008). A doçura do glicerol é tão leve que só é perceptível em vinhos secos, quando a concentração ultrapassa 5 g/L (Jackson, 2009).

No presente estudo foi observado que os vinhos inoculados com as linhagens indígenas de *S. cerevisiae* do Vale do São Francisco tiveram performances semelhantes aos produzidos pela linhagem comercial. Guimarães (2005) também encontrou resultados similares ao avaliar o desempenho das linhagens de *S. cerevisiae* selecionadas a partir de uvas americanas (*Vitis labrusca*) em Colombo (Paraná). Nos experimentos de microvinificação todas as linhagens selecionadas apresentaram características físico-químicas semelhantes ao controle (levedura comercial) e mostraram ser apropriadas para o processo de vinificação.

3.3 Caracterização molecular

Dos 76 isolados [40 para o vinho feito com a linhagem 68 (30 da fermentação alcoólica e 10 da fermentação malolática) e 36 para o vinho feito com a linhagem 152 (30 da fermentação alcoólica e seis da fermentação malolática)] de leveduras encontrados nos dois vinhos foram realizadas as extrações e restrições do DNA mitocondrial. De acordo com os perfis mitocondriais pode-se observar que o perfil molecular da linhagem de *S. cerevisiae* 152 (P152) conseguiu predominar, em frequência elevada, até o final do experimento (Figuras 1 e 2). Isto sugere que esta levedura seja uma ótima competidora e consegue se sobrepor frente a outras linhagens de *S. cerevisiae* presentes nas uvas. Entretanto outros perfis mitocondriais de *S. cerevisiae* também apareceram durante a realização do experimento. Estas leveduras tiveram o perfil 1, representando 5,6% dos isolados analisados, e o perfil da linhagem indígena de *S. cerevisiae* 68 (P68), representando 8,3% (Figura 3 e 4). Lopes et al. (2007) utilizaram esta mesma técnica de restrição do DNA mitocondrial para estudar a permanência da linhagem indígena inoculada de *S. cerevisiae*, do Norte da Patagônia (Argentina), nos vinhos produzidos naquela região. A partir da análise dos perfis obtidos, os autores puderam

concluir que a linhagem indígena estudada foi capaz de competir com a microbiota natural presente e apresentar uma maior dominância (80%) do que a linhagem comercial (30%).

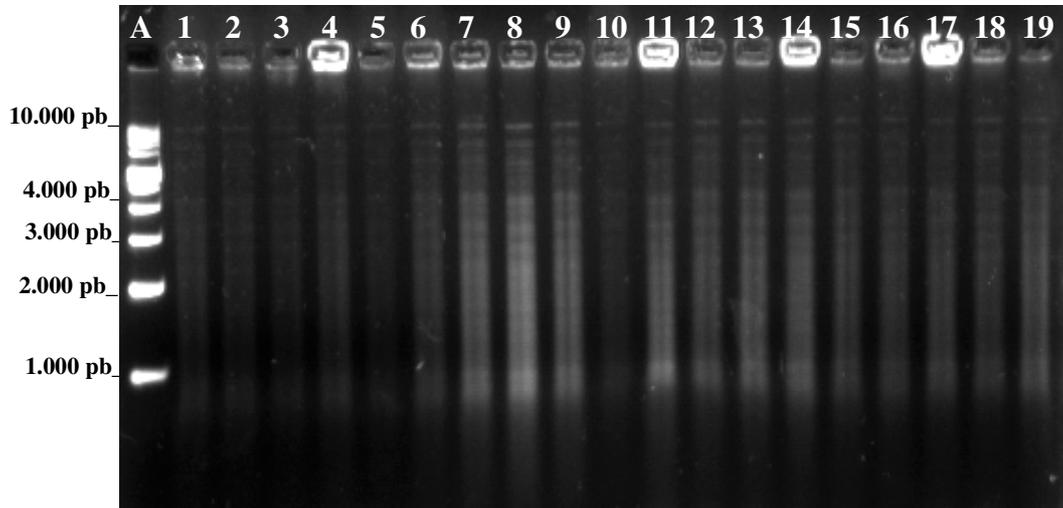


Figura 1 - Perfis de restrição do mtDNA das linhagens das leveduras isoladas da fermentação alcoólica do vinho produzido com a linhagem iniciadora 152. A - 1 Kb, padrão de peso molecular; 1 – levedura FA152V1; 2 – levedura FA152V2; 3 – levedura FA152V3; 4 – levedura FA152V4; 5 – levedura FA152V5; 6 – levedura FA152V6; 7 – levedura FA152V7; 8 – levedura FA152V8; 9 – levedura FA152V9; 10 – levedura FA152V10; 11 – levedura FA152V11; 12 – levedura FA152V12; 13 – levedura FA152V13; 14 – levedura FA152V14; 15 – levedura FA152V15; 16 – levedura FA152V16; 17 – levedura FA152V17; 18 – levedura FA152V18; 19 – levedura FA152V19.

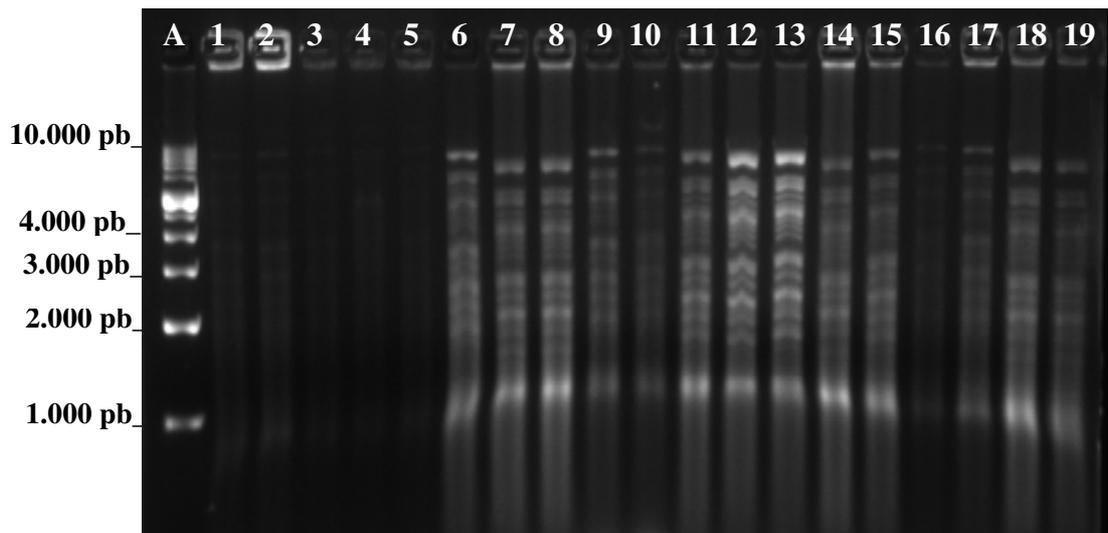


Figura 2 - Perfis de restrição do mtDNA das linhagens das leveduras isoladas da fermentação alcoólica e malolática do vinho produzido com a linhagem indígenas iniciadora 152 e da fermentação alcoólica do vinho produzido com a linhagem iniciadora 68. A - 1 Kb, padrão de peso molecular; 1 – levedura FA152V20; 2 –

levedura FA152V21; 3 – levedura FA152V22; 4 – levedura FA152V23; 5 – levedura FA152V24; 6 – levedura FA152V25; 7 – levedura FA152V26; 8 – levedura FA152V27; 9 – levedura FA152V28; 10 – levedura FA152V29; 11 – levedura FA152V30; 12 – levedura FM152V31; 13 – levedura FM152V32; 14 – levedura FM152V33; 15 – levedura FM152V34; 16 – levedura FM152V35; 17 – levedura FM152V36; 18 – levedura FA68V37; 19 – levedura FA68V38.

*Leveduras com as iniciais FA152 e FA68 correspondem às leveduras isoladas da fermentação alcoólica dos vinhos produzidos pelas respectivas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* 152 e 68. E iniciais FM152 isoladas da fermentação malolática.

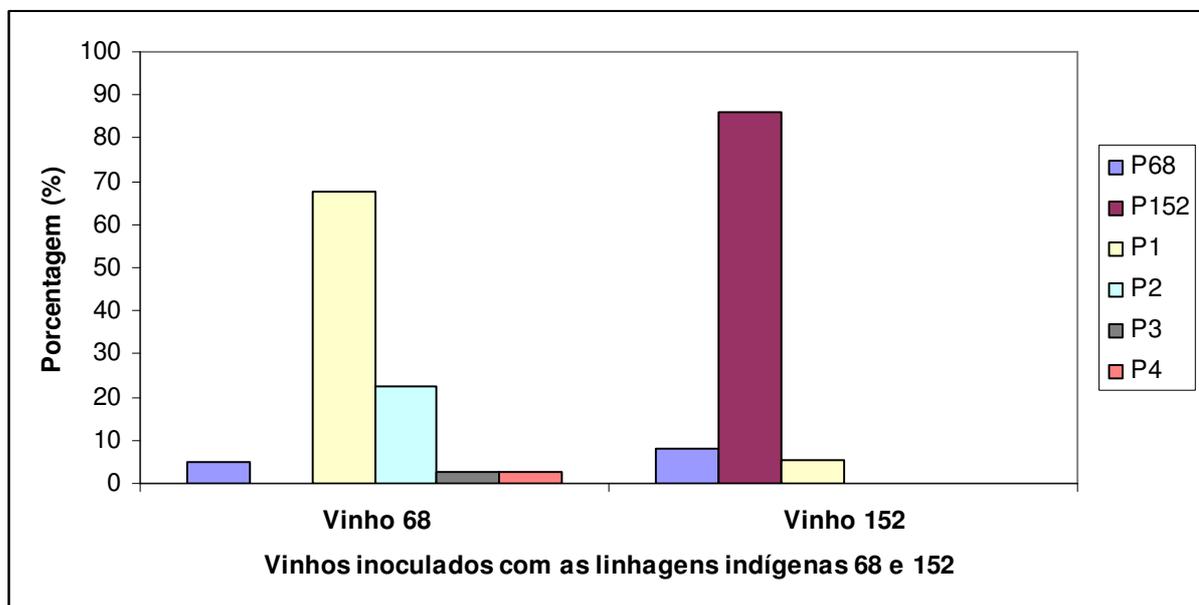


Figura 3. Porcentagem de ocorrência dos diferentes perfis moleculares, baseados na restrição do DNA mitocondrial, das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas dos vinhos produzidos com as culturas iniciadoras indígenas 68 e 152. P68 – Perfil 68; P152 – Perfil 152; P1 – Perfil 1; P2 – Perfil 2; P3 – Perfil 3; P4 – Perfil 4.

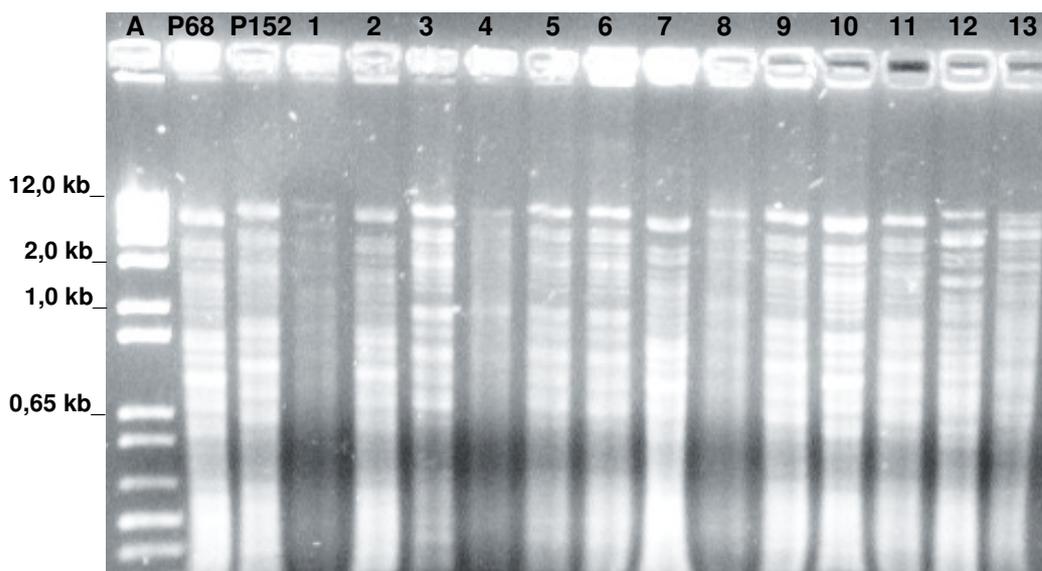


Figura 4 - Perfis de restrição do mtDNA das linhagens das leveduras isoladas da fermentação alcoólica e malolática dos vinhos produzidos com as linhagens iniciadoras indígenas 68 e 152. A - 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), padrão de peso molecular; P68 – padrão molecular da linhagem indígena de *Saccharomyces cerevisiae* 68; P152 – padrão molecular da linhagem indígena de *S. cerevisiae* 152; 1 – levedura FA152V8, perfil P152; 2 – levedura FA152V23, perfil P152; 3 – levedura FM152V32, perfil P1; 4 – levedura FA68V37, perfil P68; 5 – levedura FA68V43, perfil P1; 6 – levedura FA68V54, perfil P1; 7 – levedura FA68V41, perfil P1; 8 – levedura FA68V53, perfil P3; 9 – levedura FA68V63, perfil P1; 10 – levedura FA68V59, perfil P1; 11 – levedura FA68V61, perfil P1; 12 – levedura FM68V67, perfil P2; 13 – levedura FM68V76, perfil P4.

*Leveduras com as iniciais FA152 e FA68 correspondem às leveduras isoladas da fermentação alcoólica dos vinhos produzidos pelas respectivas linhagens de *S. cerevisiae* 152 e 68. As iniciais FM152 e FM68 correspondem às leveduras isoladas da fermentação malolática dos vinhos produzidos pelas respectivas linhagens de *S. cerevisiae* 152 e 68.

O perfil molecular da linhagem de *S. cerevisiae* 68 (P68) que foi inoculada para a produção de um dos vinhos também foi encontrado no vinho produzido com a linhagem 152. A linhagem 68 foi predominante nas cultivares de uva do Vale do São Francisco (ver capítulo 2). Este resultado sugere que a linhagem 68 foi introduzida no vinho produzido com a linhagem 152 por meio das uvas da cultivar Cabernet Sauvignon utilizadas para a realização do experimento, assim como as outras linhagens diferentes encontradas no vinho produzido

pela linhagem 68. Na figura 2, as leveduras 26, 27 e 33, isoladas do vinho produzido com a linhagem 152, pertencem ao mesmo perfil de restrição da linhagem 68 (P68).

A linhagem de *S. cerevisiae* 68 não conseguiu predominar durante o experimento de produção do vinho. Linhagens de *S. cerevisiae* que vieram junto com as uvas utilizadas no experimento predominaram ao longo da fermentação. Quatro perfis de restrição de mtDNA foram encontrados durante a produção deste vinho, e em proporção maior do que a linhagem iniciadora utilizada. A frequência destas leveduras foi de 67% para o perfil 1, 22,5% para o perfil 2, 2,5% para o perfil 3 e 2,5% para o perfil 4. Portanto, outras linhagens de *S. cerevisiae* contribuíram para os resultados encontrados nas análises físico-químicas do vinho produzido com linhagem 68. De acordo com Schuller et al. (2005), a ampla distribuição de uma linhagem não está necessariamente relacionada com um melhor potencial tecnológico, pois as forças seletivas que atuam num vinhedo são totalmente diferentes daquelas encontradas no mosto de fermentação das uvas. Apesar da linhagem 68 ter sido a mais frequente isolada de mosto naturalmente fermentado de uva (capítulo 2), esta linhagem não conseguiu prevalecer durante a produção do vinho.

A levedura indígena 152 conseguiu se adaptar bem quando foi utilizada para produzir vinho na região. Contudo, a linhagem 68 não foi capaz de permanecer dominando a fermentação até o final do experimento, já que outras leveduras indígenas foram encontradas. A linhagem 152 mostrou potencial para ser utilizada como cultura iniciadora na produção de vinhos no Vale do São Francisco, no entanto, estudos como a análise sensorial dos vinhos, inóculo inicial ideal, compostos secundários produzidos, entre outros, são ainda necessários.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa de mestrado e auxílio financeiro, ao FINEP pelo apoio financeiro (projeto INOVASE), à Fazenda Ouro Verde/Miolo (BA) pela doação das uvas e apoio científico.

REFERÊNCIAS

ABNT (1997a) Acidez titulável total, volátil total e fixa – NBR 13856. São Paulo: Associação Brasileira de Normas Técnicas.

ABNT (1997b) Determinação do teor alcoólico – NBR 13920. São Paulo: Associação Brasileira de Normas Técnicas.

Andrietta, S. R., Andrietta, M. G. S., Rodrigues, M. I., 1995. Métodos de caracterização de leveduras de processo industrial utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. Soc. Tecnol. Álcool Beb., Piracicaba, 13, 22-55.

Barros Lopes, M., Soden, A., Henschke, P.A., Langridge, P., 1996. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4514-4520.

Blasi, C. T., 2004. Análise do consumo e constituintes químicos dos vinhos produzidos da quarta colônia de imigração italiana do Rio Grande do Sul e sua relação com as frações lipídicas sanguíneas. Santa Maria, 91p.

Brasil. Lei nº 10.970, de 12 de Novembro de 2004. Altera dispositivos da Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 16 nov. 2004.

- Brasil. Ministério da Agricultura. Portaria nº76 de 26 de novembro de 1986. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre. Diário Oficial da República federativa do Brasil, Brasília, 28 nov. 1986. Seção1, pt. 2.
- Cappello, M. S., Bleve, G., Grieco, F., Dellaglio, F., Zacheo, G., 2004. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. J. Appl. Microbiol. 97, 1274–1280.
- Carrasco, P., Querol, A., 2001. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. Arch. Microbiol. 175, 450-457.
- Ciani, M., Mannazzu, I., Marinangeli, P., Clementi, F., Martini, A., 2004. Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. Antonie van Leeuwenhoek 85, 159-164.
- Clemente-Jimenez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J., Rodríguez-Vico, F., 2005. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. Int. J. Food Microbiol. 98, 301-308.
- Corazza, M. L., Rodrigues, D. G., Nozaki, J., 2001. Preparação e caracterização do vinho de laranja, Química Nova 24, nº.4, 449-452.
- Demuyter, C., Lollier, M., Legras, J.-L., Le Jeune, C., 2004. Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery. J. Appl. Microbiol. 97, 1140–1148.
- Esteve-Zarzoso, B., Gostíncar, A., Bobet, R., Uruburu, F., Querol, A., 2000. Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the ‘El Penedès’ area (Spain). Food Microbiol. 17, 553-562.
- Fernández-Espinar, M. T., López, V., Ramón, D., Bartra, E., Querol, A., 2001. Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. Int. J. Food Microbiol. 70, 1–10.

- Fleet, G. H., 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* 8, 979–995.
- Fleet, G. H., Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon, P., 1984. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1034-1038.
- Frezier, V., Dubourdieu, D., 1992. Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 375–380.
- Gomes, F. C. O., 2006. Produção de cachaça artesanal utilizando linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* e por fermentação espontânea, com a caracterização química e sensorial da bebida e das bactérias do ácido lático associadas ao processo. Belo Horizonte: Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, 120p. (Tese de Doutorado).
- Gomes, F. C. O.; Silva, C. L.; Marini, M. M.; Oliveira, E. S.; Rosa, C. A. Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. **J. Appl. Microbiol.**, v. 103, p. 2438-2447, 2007.
- González-Pérez, J. A.; González, R.; Querol, A.; Sendra, J.; Ramón, D. Construction of a recombinant wine yeast strain expressing b-(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification processes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 2801-2806, 1993.
- Guerra, C. C., Zanus, M. C., 2004. Características analíticas e sensoriais de vinhos produzidos no Vale do Submédio São Francisco, Brasil. Anais de Congressos, 1º WIP. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/anais/wip2004/185.pdf>>. Acessado 05 novembro 2009.
- Guimarães, T. M., 2005. Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho. Curitiba, 117p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná.

- Jackson, R. S., 2008. Wine Science: Principles and Applications. Academic Press, 3^a ed., San Diego, CA, pp.776.
- Jackson, R. S., 2009. Wine Tasting. Academic Press, 2^a ed., San Diego, CA, pp.512.
- Lopandic, K., Tiefenbrunner, W., Gangl, H., Mandl, K., Berger, S., Leitner, G., Abd-Ellah, G. A., Querol, A., Gardner, R. C., Sterflinger, K., Prillinger, H., 2008. Molecular profiling of yeasts isolated during spontaneous fermentations of Austrian wines. FEMS Yeast Res. 8, 1063–1075.
- Lopes, C. A, Rodríguez, M. E., Sangorrín, Querol, A., Caballero, A. C., 2007. Patagonian wines: implantation of an indigenous strain of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentations conducted in traditional and modern cellars. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 34, 139–149.
- Lopes, C. A, Van Broock, M., Querol, A., Caballero, A. C., 2002. *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. J. Appl. Microbiol. 93, 608–615.
- Miller, G. L., 1959. Use of Dynitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chem. 31, 426-428.
- Oliveira, E. S., Cardello, H. M. A. B., Jeronimo, E. M., Souza, E. L. R., Serra, G. E., 2005. The influence of different yeasts on the fermentation, composition and sensory quality of cachaça. W. J. Microbiol. Biotechnol. 21, 707-715.
- Oliveira, E. S., Rosa, C. A., Morgano, M. A., Serra, G. E., 2004. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. W. J. Microbiol. Biotechnol. 19, 241-243.
- Polsinelli, M., Romano, P., Suzzi, G., Mortimer, R., 1996. Multiple strains of *Saccharomyces cerevisiae* on a single grape vine. Lett. Appl. Microbiol. 23, 110- 114.
- Pretorius, I. S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millenium: novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast 16, n°. 8, 675-729.

- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramón, D., 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeasts strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2948-2953.
- Querol, A., Barrio, E., Ramón, D., 1994. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *Int J Food Microbiol.* 21, 315-323.
- Querol, A.; Fleet, G. H. (Eds), 2006. *Yeasts in Food and Beverages*. Springer, Heidelberg, pp.453.
- Querol, A., Ramón, D., 1996. The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends Food Sci. Technol.* 7, 73-78.
- Regodón, J. A., Pérez, F., Valdés, M. E., De Miguel, C., Ramírez, M., 1997. A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *J. Food Microbiol.* 14, 247-254.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., 2006. *The Microbiology of Wine and Vinifications. Handbook of Enology*, Ed. Wiley, 2^a ed., v. 1, pp.441, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England.
- Rosini, G., 1984. Assessment of dominance of added yeast in wine fermentation and origin of *Saccharomyces cerevisiae* in wine-making. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 30, 249-256.
- Sanni, A. I., Loner, C., 1993. Identification of yeasts isolated from Nigerian traditional alcoholic beverages. *Food Microbiol.* 10, 517-523.
- Santos, J. I., 2008. *Vinhos: O Essencial*. SENAC São Paulo, 7^a ed., pp.412, São Paulo, SP.
- Schuller, D., Alves, H., Dequin, S., Casal, M., 2005. Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde region of Portugal. *FEMS Microbiol Ecol.* 51, 167-177.

- Silva, C. L. C., Rosa, C. A., Oliveira, E. S. O., 2006. Studies on the kinetics parameters for alcoholic fermentation by flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strains and non-hydroxy sulfite-producing strains. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 857-863.
- SIVAR 5,0 SISTEMA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA. Copyright Daniel Furtado Ferreira. DEX/UFLA – Lavras. 1999-2003.
- Sniegowski, P. D., Dombrowski, P. G., Fingerman, E., 2002. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS Yeast Res.* 1, 306.
- Tosetto, M. G, Andrietta, S. R., 2003. Cinética de produção de glicerol em processo de fermentação alcoólica utilizando diferentes matérias primas industriais. In: Simpósio Nacional de Fermentações, Florianópolis. Anais do 14º SINAFERM, Florianópolis, CDROM.
- Valero, E., Cambon, B., Schüller, D., Casal, M., Dequin, S., 2007. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Res.* 7, 317–329.

CONCLUSÕES GERAIS

5 CONCLUSÕES GERAIS

- Os mostos fermentados das cinco variedades de uva (*Vitis vinifera* L.) colhidas no Vale do São Francisco foram substratos apropriados para o isolamento de leveduras das espécies *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii*, *P. guilliermondii*, *P. galeiformis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. zemplinina*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Kloeckera apis*. Estas leveduras fazem parte da microbiota da uva, e estão adaptadas às condições ecológicas presentes na região.
- A análise dos perfis de restrição do DNA mitocondrial dos 155 isolados de *S. cerevisiae* obtidos do mosto naturalmente fermentado dos cultivares de uva da região foi capaz de mostrar a presença de quatro linhagens indígenas desta espécie. Este resultado mostra que linhagens indígenas de *S. cerevisiae* podem ser obtidas das uvas da região do Vale do São Francisco para estudos biotecnológicos.
- Das linhagens indígenas de *S. cerevisiae* do Vale do São Francisco, as linhagens 68 e 152 apresentaram melhores resultados nos parâmetros cinéticos da fermentação em meio sintético, e foram escolhidas para a produção de vinho em escala piloto. Estas linhagens apresentaram comportamento fisiológico similar à linhagem comercial mais utilizada para a produção de vinho na região.
- Os vinhos produzidos pelas linhagens de *S. cerevisiae* indígenas 68 e 152 foram semelhantes nas análises físico-químicas (pH, densidade, acidez total, acidez volátil, álcool, glicerol, ART, álcool) ao vinho produzido com a linhagem de *S. cerevisiae* comercial (Maurivin, AWRI 796). No entanto, somente a linhagem 152 foi capaz de predominar ao final da fermentação alcoólica e malolática, indicando o seu uso como uma possível linhagem iniciadora para a produção de vinho com características regionais. No entanto, mais estudos são necessários antes da utilização desta linhagem para a produção em larga escala de vinhos no Vale do São Francisco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT (1997a) **Acidez titulável total, volátil total e fixa – NBR 13856**. São Paulo: Associação Brasileira de Normas Técnicas.
- ABNT (1997b) **Determinação do teor alcoólico – NBR 13920**. São Paulo: Associação Brasileira de Normas Técnicas.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S.; RODRIGUES, M. I. Métodos de caracterização de leveduras de processo industrial utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. **Soc. Tecnol. Álcool Beb.**, Piracicaba, v. 13, p.22-55, 1995.
- BARRAJÓN, N.; ARÉVALO-VILLENA, M.; RODRÍGUEZ-ARAGÓN, L. J.; BRIONES, A. Ecological study of wine yeast in inoculated vats from La Mancha region. **Food Control**, v. 20, p.778–783, 2009.
- BARROS LOPES, M.; SODEN, A.; HENSCHKE, P.A.; LANGRIDGE, P. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p.4514-4520, 1996.
- BISSON, L.F. Stuck and sluggish fermentations. **Am. J. Enol. Vitic.**, v.50, p.107-119, 1999.
- BOWERS, J. E.; MEREDITH, C. P. The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon. **Nature Genetics**, v. 16, p.84–87, 1997.
- BRASIL. Lei nº 10.970, de 12 de Novembro de 2004. **Altera dispositivos da Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências**. Diário Oficial da União, Brasília, 16 nov. 2004.

- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº76 de 26 de novembro de 1986. **Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre.** Diário Oficial da República federativa do Brasil, Brasília, 28 nov. 1986. Seção1, pt. 2.
- CAPPELLO, M.S.; BLEVE, G.; GRIECO, F.; DELLAGLIO, F.; ZACHEO, G. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. **J. Appl. Microbiol.**, v. 97, p.1274–1280, 2004.
- CARRASCO, P.; QUEROL, A. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. **Arch. Microbiol.**, v. 175, 450-457, 2001.
- CHAVAN, P.; MANE, S.; KULKARNI, G.; SHAIKH, S.; GHORMADE, V.; NERKAR, D. P.; SHOUCHE, Y.; DESHPANDE, M. V. Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. **Food Microbiol.**, v. 26, p.801–808, 2009.
- CIANI, M., MANNAZZU, I; MARINANGELI, P.; CLEMENTI, F.; MARTINI, A. Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek.**, v. 85, p. 159-164, 2004.
- CLEMENTE-JIMENEZ, J. M.; MINGORANCE-CAZORLA, L.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, S.; LAS HERAS-VÁZQUEZ, F. J.; RODRÍGUEZ-VICO, F. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 98, p.301-308, 2005.
- CLEMENTE-JIMENEZ, J.M.; MINGORANCE-CAZORLA, L.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, S.; LAS HERAS-VÁZQUEZ, F. J.; RODRÍGUEZ-VICO, F. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. **Food Microbiol.**, v. 21, p.149–155, 2004.
- COCOLIN, L.; BISSON, L. F.; MILLS, D. A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 189, p.81-87, 2000.

- CORAZZA, M. L.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J. Preparação e caracterização do vinho de laranja, **Química Nova**, v. 24, nº.4, p.449-452, 2001.
- DE LA TORRE, M. J.; MILLAN, M. C.; PEREZ-JUAN, P. M.; MORALES, J.; ORTEGA, J.M. Indigenous yeasts associated with two *Vitis vinifera* grape varieties cultured in southern Spain. **Microbios**, v. 100, p.27–40, 1999.
- DEMUYTER, C.; LOLLIER, M.; LEGRAS, J.-L.; LE JEUNE, C. Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery. **J. Appl. Microbiol.**, v. 97, p.1140–1148, 2004.
- ESTEVE-ZARZOSO, B.; GOSTÍN CAR, A.; BOBET, R.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the ‘El Penedès’ area (Spain). **Food Microbiol.**, v. 17, p.553-562, 2000.
- FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; FONESCA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 50, p.1351–1371, 2000.
- FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T.; LÓPEZ, V.; RAMÓN, D.; BARTRA, E.; QUEROL, A. Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 70, p.1–10, 2001.
- FLEET, G. H. Wine. **In:** DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. (Eds.), Food microbiology fundamentals and frontiers, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC, p.747-772, 2001.
- FLEET, G. H. Wine yeasts for the future. **FEMS Yeast Res.**, v. 8, p.979–995, 2008.
- FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 87, p.11–22, 2003.

- FLEET, G. H.; LAFON-LAFOURCADE, S.; RIBÉREAU-GAYON, P. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 48, p.1034-1038, 1984.
- FLEET, H.; HEARD, G. M. Yeasts: growth during fermentation. **In:** FLEET, H. Wine Microbiology and Biotechnology. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, p.27-54, 1993.
- FREZIER, V.; DUBOURDIEU, D. Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 43, 375–380, 1992.
- FUGELSANG, K. C.; EDWARDS, C. G. **Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures**. 2^a ed. New York: Springer, 2007.
- GALET, P. **Cépages et vignobles de France. Les vignes américaines**. Montpellier: Déhan, v. 1, 553p., 1988.
- GIL, A.C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. São Paulo: Atlas, 1996.
- GOMES, F. C. O. **Produção de cachaça artesanal utilizando linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* e por fermentação espontânea, com a caracterização química e sensorial da bebida e das bactérias do ácido láctico associadas ao processo**. Belo Horizonte: Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2006. 120p. (Tese de Doutorado).
- GOMES, F. C. O.; SILVA, C. L.; MARINI, M. M.; OLIVEIRA, E.S.; ROSA, C.A. Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. **J. Appl. Microbiol.**, v. 103, p. 2438-2447, 2007.
- GONZÁLEZ, S. S.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain). **J. Appl. Microbiol.**, v. 102, p.1018–1025, 2007.

- GONZÁLEZ-PÉREZ, J. A.; GONZÁLEZ, R.; QUEROL, A.; SENDRA, J.; RAMÓN, D. Construction of a recombinant wine yeast strain expressing b-(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification processes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 2801-2806, 1993.
- GUERRA, C. C.; ZANUS, M. C. **Características analíticas e sensoriais de vinhos produzidos no Vale do Submédio São Francisco, Brasil.** 2004. Anais de Congressos, 1º WIP. Acessado 05/11/2009 (<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/anais/wip2004/185.pdf>)
- GUERRA, J. B.; ARAÚJO, R.A.C.; PATARO, C.; FRANCO, G.R.; MOREIRA, E.S.A.; MENDONÇA-HAGLER, L.C., ROSA, C.A. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 33, p.106-111, 2001.
- GUIMARÃES, T. M. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho.** Curitiba, 2005. 117p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná.
- HANNA INSTRUMENTS. **Produção de vinho ganha mais espaço no Vale do São Francisco.** Disponível em: <<http://www.hannabrasil.com/noticias-artigos-e-dica-domes/noticias/257-producao-de-vinho-ganha-mais-espaco-no-vale-do-sao-francisco>>. Acessado em 10 de fevereiro de 2010.
- JACKSON, R. S. **Wine Science: Principles and Applications.** Academic Press, 3ª ed., 776p. San Diego, CA, 2008.
- JACKSON, R. S. **Wine Tasting.** Academic Press, 2ª ed., 512p. San Diego, CA, 2009.
- JEMEC, K. P.; CADEZ, N.; ZAGORC, T.; BUBIC, V.; ZUPEC, A.; RASPOR, P. Yeast population dynamics in five spontaneous fermentations of Malvasia must. **Food Microbiol.**, v. 18, p.247-259, 2001.

- KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The yeasts: a taxonomic study**. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1984.
- KURTZMAN, C. P., FELL, J. **The yeasts - a taxonomic study**. 4th. ed. Elsevier Science Plub. B. V. Amsterdm, the Netherlands, 1998.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. Yeast systematics and phylogeny - implications of molecular identification methods for studies in ecology. **In:** Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, The Yeast Handbook, Rosa CA & Péter G (eds), pp. 11-30 Springer-Verlag, Heidelberg, 2006.
- KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek.**, v. 73, n° 4, p. 331- 371, 1998.
- KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J.; BASEHOAR-POWERS, E. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen.nov., *Lindnera* gen.nov. and *Wickerhamomyces* gen.nov. **FEMS Yeast Res.**, v. 8, p.939–954, 2008.
- KURTZMAN, C. P.; SMILEY, M. J. Heterothallism in *Pichia kudriavzevii* and *Pichia terricola*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 42, p.355-363, 1976.
- LACHANCE, M. A.; DANIEL, H. M.; MEYER, W.; PRASAD, G. S.; GAUTAM, S. P.; BOUNDY-MILLS, K. The D1/D2 domain of the large subunit rDNA of the yeast species *Clavispora lusitaniae* is unusually polymorphic. **FEMS Yeast Res.**, v. 4, p.253–258, 2003.
- LEHTONEN, M.; JOUNELA-ERIKSSON, P. Volatile and non-volatile compounds in the flavour of alcoholic beverages. **In:** PIGGOTT, J. R. Flavour of distilled beverages: Origin and Development. Florida: Verlag Chemie Internacional Inc., p.64-78, 1983.

- LONGO, E.; VELAZQUEZ, J.B.; SIERO, C.; CANSADO, J.; CALO, P.; VILLA, T.G. Production of higher alcohols, ethyl acetate, acetaldehyde and other compounds by 14 *Saccharomyces cerevisiae* wine strains isolated from the same region (Salnés, N. W. Spain). **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 8, p.539-541,1992.
- LOPANDIC, K.; TIEFENBRUNNER, W.; GANGL, H.; MANDL, K.; BERGER, S.; LEITNER, G.; ABD-ELLAH, G. A.; QUEROL, A.; GARDNER, R. C.; STERFLINGER, K.; PRILLINGER, H. Molecular profiling of yeasts isolated during spontaneous fermentations of Austrian wines. **FEMS Yeast Res.**, v. 8, p.1063–1075, 2008.
- LOPANDIC, K.; ZELGER, S.; BÁNSZKY, L. K.; ELISKASES-LECHNER, F.; PRILLINGER, H. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. **Food Microbiol.**, v. 23, p.341–350, 2006.
- LOPES, C. A; RODRÍGUEZ, M. E.; SANGORRÍN, QUEROL, A.; CABALLERO, A. C. Patagonian wines: implantation of an indigenous strain of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentations conducted in traditional and modern cellars. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 34, 139–149, 2007.
- LOPES, C.A; VAN BROOCK, M.; QUEROL, A.; CABALLERO, A. C. *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. **J. Appl. Microbiol.**, v. 93, p.608–615, 2002.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. 8^a ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997.
- MARTINELLI FILHO, A. 1983. **Tecnologia de vinhos e vinagres de frutas**. Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ/USP. Piracicaba, São Paulo, 130p.

- MARTINI, A.; VAUGHAN-MARTINI, A. Grape must fermentation: past and present. **In:** SPENCER, J.T.D.F., SPENCER, M. (Eds.), *Yeast Technology*. Springer Verlag, Berlin, Germany, p. 105-1123, 1990.
- MILLER, G.L. Use of Dynitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chem.**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MILLS, D. A.; JOHANNSEN, E. A.; COCOLIN, L. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p.4884–4893, 2002.
- MIN. Ministério da Integração Nacional. **Nova Delimitação do Semi-Árido Brasileiro**. 10 de março, 2005.
- MORTIMER, R.K.; POLSINELLI, M. On the origins of wine yeast. **Res. Microbiol.**, v.150, p.199-204, 1999.
- NAUMOV, G.I. Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.17, p.295-302, 1996.
- OLIVEIRA, E.S.; CARDELLO, H. M.A. B.; JERONIMO, E. M.; SOUZA, E. L. R.; SERRA, G.E. The influence of different yeasts on the fermentation, composition and sensory quality of cachaça. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 21, p. 707-715, 2005.
- OLIVEIRA, E.S.; ROSA, C.A.; MORGANO, M.A.; SERRA, G.E. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 19, p.241-243, 2004.
- PATARO, C.; GUERRA, J.B; PETRILLO-PEIXOTO, M.L; MENDONÇA-HAGLER, L.C; LINARDI, V.R; ROSA, C.A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, p.1-9, 2000.

- POLSINELLI, M.; ROMANO, P.; SUZZI, G.; MORTIMER, R. Multiple strains of *Saccharomyces cerevisiae* on a single grape vine. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 23, p.110- 114, 1996.
- PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millenium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n°. 8, p. 675-729, 2000.
- QUEROL, A.; BARRIO, E.; HUERTA, T.; RAMÓN, D. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeasts strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 2948-2953, 1992.
- QUEROL, A.; BARRIO, E.; RAMÓN, D. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. **Int J Food Microbiol.**, v. 21, p. 315-323, 1994.
- QUEROL, A.; FERNANDEZ-ESPINAR, M.T.; DEL OLMO, M.; BARRIO, E. Adaptive evolution of wine yeast. **Int. J. Food Microbiol.**, v.86, p.3-10, 2003.
- QUEROL, A.; FLEET, G. H. (Eds). **Yeasts in Food and Beverages**. Springer, Heidelberg, 453 p., 2006.
- QUEROL, A.; RAMÓN, D. The application of molecular techniques in wine microbiology. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 7, p.73-78, 1996.
- REGODÓN, J. A.; PERÉZ, F.; VALDÉS, M. E.; DE MIGUEL, C.; RAMÍREZ, M. A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. **J. Food Microbiol.**, v. 14, p.247–254, 1997.
- RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. **The Microbiology of Wine and Vinifications**. Handbook of Enology, Ed. Wiley, 2^a ed., v. 1, 441p, 2006. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England.
- ROSINI, G. Assessment of dominance of added yeast in wine fermentation and origin of *Saccharomyces cerevisiae* in wine-making. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 30, p.249-256, 1984.

- SABATE, J.; CANO, J.; QUEROL, A; GUILLAMÓN, J.M. Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 26, p.452-455, 1998.
- SANNI, A. I.; LONER, C. Identification of yeasts isolated from Nigerian traditional alcoholic beverages. **Food Microbiol.**, v. 10, p.517-523, 1993.
- SANTOS, J. I. **Vinhos: O Essencial**. SENAC São Paulo, 7ª ed., 412p. São Paulo, SP, 2008.
- SCHULLER, D.; ALVES, H.; DEQUIN, S.; CASAL, M. Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde region of Portugal. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 51, p.167–177, 2005.
- SILVA, C.L.C.; ROSA, C.A.; OLIVEIRA, E.S.O. Studies on the kinetics parameters for alcoholic fermentation by flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strains and non-hydroxy sulfite-producing strains. **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, p.857-863, 2006.
- SIPICZKI, M. *Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 53, p.2079–2083, 2003.
- SIVAR 5,0 **Sistema de Análise de Variância**. Copyrigh Daniel Furtado Ferreira. DEX/UFLA – Lavras. 1999-2003.
- SNIEGOWSKI, P.D.; DOMBROWSKI, P.G.; FINGERMAN, E. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. **FEMS Yeast Res.**, v. 1, p.306, 2002.
- TOSETTO, M. G; ANDRIETTA, S. R. Cinética de produção de glicerol em processo de fermentação alcoólica utilizando diferentes matérias primas industriais. In: Simpósio

- Nacional de Fermentações, Florianópolis. **Anais do 14º SINAFERM**, Florianópolis, 2003. CDROM.
- UEDA-NISHIMURA, K.; MIKATA, K. Reclassification of *Pichia scaptomyzae* and *Pichia galeiformis*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 79, p.371–375, 2001.
- URSO, R.; RANTSIOU, K.; DOLCI, P.; ROLLE, L.; COMI, G.; COCOLIN, L. Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods. **FEMS Yeast Res.**, v. 8, p.1053–1062, 2008.
- VALE BUSINESS. **Vale do São Francisco: 500 Anos de Integração Nacional**. Home Page desenvolvida pela SYS Computing. Disponível em: <<http://www.valedosaofrancisco.com.br/OVale/SubdivisaodoVale-Submedio.asp>>. Acessado em 10 de fevereiro de 2010.
- VALERO, E.; CAMBON, B.; SCHÜLLER, D.; CASAL, M.; DEQUIN, S. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. **FEMS Yeast Res.**, v. 7, p.317–329, 2007.
- VAN DER WALT, J.P.; YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. **In:** The yeasts: a taxonomic study. Elsevier Publishers BV, Amsterdam, p.45-104, 1984.
- VERSAVAUD, A.; COURCOUX, P. ; ROULLAND, C. ; DULAU, L. ; HALLET, J. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p.3521-3529, 1995.
- VEZINHET, F.; HALLET, J. N.; VALADE, M.; POULARD, A. Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 43, p.83-86, 1992.

YARROW, D. Methods for isolation and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C.P.;
FELL, J.W. **The yeasts, a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier. p. 77-100, 1998.