



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**CAMILA MUNIQUE PAULA BALTAR SILVA DE PONZZES
GOMES**

**LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae* ISOLADAS DE
UVAS DO VALE DO SÃO FRANCISCO COMO
PRODUTORAS DE VINHOS**

Feira de Santana, BA
2015

CAMILA MUNIQUE PAULA BALTAR SILVA DE PONZZES GOMES

**LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae* ISOLADAS DE
UVAS DO VALE DO SÃO FRANCISCO COMO
PRODUTORAS DE VINHOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa (UFMG)

Co-orientadores: Dr. Giuliano Elias Pereira (Embrapa Semiárido/Uva
e Vinho)

Profa. Dra. Rita de Cássia Trindade (UFS)

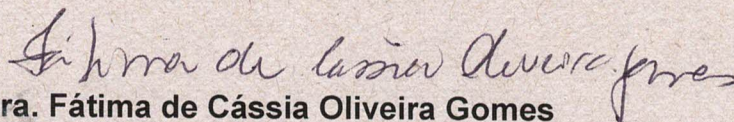
Feira de Santana, BA
2015

BANCA EXAMINADORA



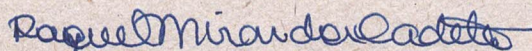
Dra. Amparo Querol Simón

(Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos/CSIC –Valencia/Espanha)



Dra. Fátima de Cássia Oliveira Gomes

(Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais)



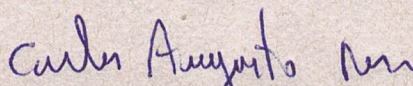
Dra. Raquel Miranda Cadete

(Universidade Federal de Minas Gerais)



Dr. Aristoteles Góes Neto

(Universidade Estadual de Feira de Santana)



Dr. Carlos Augusto Rosa

(Universidade Federal de Minas Gerais)
Orientador e Presidente da Banca

**Belo Horizonte – BA
2015**

AO MEU ESPOSO

Cássio Ferreira Gomes

AOS MEUS PAIS

José Silva de Ponzzes

Maria de Fátima Baltar Silva de Ponzzes

AOS MEUS IRMÃOS

Half Yuri Nicholas Baltar Silva de Ponzzes

Jôse Noemia Baltar de Ponzzes Calasans

AO MEU TIO

Paulo Henrique Carvalho Baltar de Oliveira

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve presente em todos os meus momentos de felicidades e tristezas, sempre me dando a confiança de que tudo daria certo e em seu tempo oportuno. Ele que me mostrou que apesar de todas as pedras impostas por esse mundo há sempre a luz que reina, e essa luz é o amor.

Ao meu esposo, Cássio, que sofreu e sorriu junto comigo durante essa fase do doutorado. Só ele, juntamente com minha família, sabem os caminhos que tive que percorrer e o quanto tive que lutar para conseguir realizar meu sonho de tornar-me Doutora. Deus escolheu bem a pessoa para viver comigo eternamente. Sua presença me faz muito bem e sua mão me ajuda a ir mais longe. Amo você!

Aos meus pais, Ponzzes (painho) e Fátima (mainha), que tanto me amam e torcem para meu sucesso, em tudo que eu faça. Sei que o exemplo de vocês se perpetua comigo em tudo que toco e falo. A paixão de vocês transborda e sou fruto disso, pois na vida sou uma replicadora dos seus ensinamentos e da dignidade ímpar de vocês. Ensinaram-me a voar, e assim sigo voando. Obrigada por tudo, o que sou hoje vem de vocês!

Aos meus irmãos, Jôse e Half e ao meu tio Paulo Henrique, que estão comigo em todos os lugares a que vou: mesmo longe sempre estão dentro de mim, pois o nosso amor é eterno e com vocês sou mais forte. Amo muito vocês!

À Coordenação e aos Professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, que me ajudaram nessa caminhada e de quem nunca irei esquecer-me. Admiração se constrói assim, pois competência e conhecimento aprendi bastante com vocês e me tornei mais completa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa, que com sua exigência e detalhismo transforma uma pedra bruta numa lapidada. Sei que sempre quis o meu melhor e sempre fez de tudo para me ajudar a conquistar esse objetivo. Orgulho-me de tê-lo como orientador desde o mestrado e de ter adquirido seus ensinamentos. Sou eternamente grata!

Ao meu co-orientador, Pesquisador Dr. Giuliano Elias Pereira, pela grande admiração e carinho que sempre teve pelo nosso trabalho e sempre fez de tudo para me deixar confortável nos ensinamentos da Enologia. Creio que sua orientação e dedicação é um exemplo a seguir. Mesmo estando longe, tentou de todas as formas estar presente e sempre conseguindo. Sou muito feliz de tê-lo como co-orientador e parceiro nesta caminhada que vem desde a minha graduação. Sei que o Vale do São Francisco está em boas mãos e fico feliz também porque pude e posso contribuir muito também, principalmente, com sua ajuda.

Agradeço também a todos do Laboratório de Enologia da EMBRAPA Semiárido (Petrolina/PE), principalmente Joyce e Antero que me ajudaram bastante, ficando até tarde da noite elaborando os vinhos comigo. Não posso deixar de agradecer também ao Microbiologista Dr. Carlos Alberto Tuão Gava do Laboratório de Controle Biológico e aos seus alunos.

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Rita De Cássia Trindade, por sua eterna admiração pela área e por sua amizade. O meu começo se deu com sua ajuda, sua inspiração e seu amor.

Às Fazendas Ouro Verde/Miolo (Casa Nova/BA), Botticelli/Milano (Santa Maria/PE), Ducos Vinícola (Lagoa Grande/PE) e Vinibrasil/Rio Sol (Lagoa Grande/PE) por terem cedido as uvas para o desenvolvimento deste doutorado.

Ao Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) da Universidade Federal de Sergipe (UFS), em especial minha grande amiga Kamila que sempre me ajudou em tudo de que eu precisei. Aprendemos e sofremos juntas, assim se faz Ciência e assim se faz com amor. À minha “mami” científica, Dângelly, e ao meu “papi” científico, Antônio Márcio (Tony), que sempre cuidaram de mim como uma filha e não como uma bolsista de iniciação científica. Sempre serei eternamente grata e sei que estaremos sempre juntos. Agradeço também as amigas e colegas de laboratório Aninha (Ana Nery) e Anuska (rimos bastante de diversas situações e sempre nos apoiando). Meu muito obrigada a todos do LMA, que me ajudaram na fase mais delicada durante uma etapa dessa minha vida. Mesmo sem saberem, vocês me confortaram!

Ao Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), que durante toda a etapa do meu doutorado esteve comigo, e, em especial, às pessoas que mais me ajudaram, apoiaram e ganharam a minha admiração para sempre: Raquel Cadete, Marco Aurélio e Monaliza.

Ao Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE), que fez de tudo para me receber bem e fez com excelência. Tudo que sei de Cromatografia Gasosa devo a vocês. Mesmo na correria, conseguimos! Agradecimento especial a Dr. Kirley Canuto, Dr. Guilherme, Tigressa e Lorena.

Às minhas amiga excepcionais da UEFS, Mona Liza e Aline, que se tornaram meu apoio, ajudamo-nos em tudo, principalmente no emocional. Somos um tripé, tenho certeza disso. Amo muito vocês!

À Amparo Querol, que foi um dos maiores presentes que tive, sua orientação, pegando nas minhas mãos e dizendo por onde seguir fez com que minha tese tivesse um brilho a mais, ajudando-me no momento mais crítico e desencadeando assim outros caminhos brilhantes. Minha eterna admiração e espero sempre manter contanto. Não posso deixar de agradecer também ao Bruno Motta que com um oceano nos separando conseguiu me ajudar, fosse a qualquer hora e dia. Muito obrigada!

Por fim, agradeço a todos que fizeram parte direta e indiretamente da realização desse meu sonho e que junto comigo venceram, pois sei que os resultados são lindos frutos e distribuições de conhecimentos adquiridos.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi selecionar linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas do mosto fermentado de uvas (*Vitis vinifera* L.) cultivadas no Vale do Submédio do São Francisco (VSF), como iniciadoras do processo fermentativo na elaboração de vinhos. Foram obtidos 368 isolados, sendo 259 *S. cerevisiae* e 109 não-*Saccharomyces*. Por meio da análise de restrição do DNA mitocondrial (RFLP-mtDNA) foi possível identificar 184 *S. cerevisiae* indígenas e 75 representando linhagens comerciais. Foram encontrados 22 perfis de RFLP-mtDNA nas *S. cerevisiae* indígenas comparadas com as seis leveduras comerciais de *S. cerevisiae* mais utilizadas no VSF. Das 184 *S. cerevisiae* indígenas, 46 não produziram H₂S. Microfermentações de 80 *S. cerevisiae* indígenas e seis comerciais foram realizadas em mosto sintético. No final da fermentação alcoólica foram determinados o etanol, os compostos secundários produzidos e o consumo de açúcares. A partir desses resultados, nove linhagens indígenas de *S. cerevisiae* foram selecionadas. Além dessas, duas *S. cerevisiae* comerciais foram utilizadas para a produção dos vinhos em pequena escala. Os parâmetros fermentativos das leveduras foram semelhantes durante a produção dos vinhos. Trinta e três compostos voláteis foram identificados, sendo que o vinho 8 apresentou melhores concentrações dos compostos aromáticos frutados. O composto volátil 2-fenil-etanol (aroma floral, rosas) foi produzido em concentração elevada nos vinhos 7, 8 e 9, muito acima dos demais vinhos. Essas linhagens podem, no futuro, ser utilizadas na produção dos vinhos do VSF contribuindo para a tipicidade das bebidas da região.

Palavras-chave: Leveduras. Vinho. *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentação. Vale do São Francisco. Aromas frutados e florais.

ABSTRACT

The aim of this work was to select *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated in the must fermented of grapes (*Vitis vinifera* L.) farmed in Vale do Submédio do São Francisco (VSF), as starters of the fermentative process in winemaking. A total of 368 yeast isolates were obtained. Among them, 259 *S. cerevisiae* and 109 non-*Saccharomyces* strains were identified. From mitochondrial DNA restriction analysis (RFLP-mtDNA), it was possible the identification of 184 *S. cerevisiae* indigenous strains and 75 *S. cerevisiae* representing commercial strains. Twenty-two different profiles of RFLP-mtDNA were found in *S. cerevisiae* indigenous strains in comparison with the six most used *S. cerevisiae* commercial strains in the VSF. Among 184 *S. cerevisiae* indigenous strains, 46 did not produce H₂S. Eighty *S. cerevisiae* indigenous strains and six commercial strains were used for micro fermentation experiments with synthetic must. At the end of the alcoholic fermentation process, ethanol, secondary compounds and the sugar consumption were determined. Based on the micro fermentation results, nine *S. cerevisiae* indigenous strains were selected. These strains and two *S. cerevisiae* commercial strains were used for wine production in small scale. Furthermore, fermentation parameters of yeasts were similar during the winemaking. From 33 volatile organic compounds identified, sample of wine 8 presented the best concentrations of fruity aromatic compounds. The volatile compound 2-phenylethanol (floral aroma) was obtained in an elevated concentration in the wines 7, 8, and 9 with higher levels than the other ones. After further studies, these strains may be used to produce wines in Vale do São Francisco Region, contributing for the typicity of beverage produced in that area.

Keywords: Yeasts. Wine. *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentation. Vale do São Francisco Region. Fruity and floral aroma.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
OBJETIVOS.....	12
Objetivo geral.....	12
Objetivos específicos.....	12
1. REVISÃO DE LITERATURA	13
1.1 Leveduras: principais características e métodos para identificação e diferenciação.....	13
1.2 Leveduras Vínicas	15
1.3 Linhagens vínicas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
1.4 Produção do gás sulfeto de hidrogênio (H ₂ S)	20
1.5 Vinho.....	21
1.6 Vale do Submédio do Rio São Francisco.....	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS	31
2.1 Obtenção dos micro-organismos	31
2.2 Identificação das leveduras	32
2.2.1 Caracterização molecular das linhagens <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
2.2.2 Caracterização molecular das leveduras não- <i>Saccharomyces</i>	34
2.3 Seleção das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> não produtoras do gás sulfeto de hidrogênio (H ₂ S)	37
2.4 Microfermentações com as diferentes linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
2.4.1 Micro-organismos utilizados.....	38
2.4.2 Mosto sintético de fermentação.....	38
2.4.3 Condições de fermentação	39
2.4.4 Determinação do etanol, compostos secundários e açúcares por HPLC.....	39
2.5 Produção dos vinhos em pequena escala.....	40
2.5.1 Procedimentos laboratoriais para a produção dos vinhos	40
2.5.2 Análise da presença dos compostos fenólicos totais dos vinhos.....	41
2.5.3 Determinação do etanol, compostos secundários e açúcares por HPLC.....	42
2.5.4 Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS).....	42
2.6 Análise estatística.....	43
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.1 Isolamento e identificação das leveduras	44
3.1.1 Caracterização molecular das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44

3.1.2 Identificação das leveduras não- <i>Saccharomyces</i>	57
3.2 Seleção das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> não produtoras do gás sulfeto de hidrogênio (H ₂ S)	64
3.3 Microfermentações das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66
3.4 Produção dos vinhos em pequena escala.....	72
3.4.1 Análise da presença dos compostos fenólicos totais nos vinhos.....	72
3.4.2 Consumo de açúcares e produção de etanol, glicerol e ácido acético	74
3.4.3 Determinação dos compostos voláteis nos vinhos	76
4. CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

INTRODUÇÃO GERAL

A seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* indígenas para a produção de vinhos típicos de uma região é realizada há bastante tempo na Europa, onde estão localizados os países de maior tradição na produção de vinhos de qualidade. No entanto, hoje, o Brasil também é um grande produtor de vinhos de qualidade e, em especial, é o único a produzir vinhos nas latitudes 8° e 9° Sul, chamados de vinhos tropicais, localizados na região do Submédio do Vale do São Francisco. Essa região engloba as partes dos estados da Bahia e Pernambuco, banhadas pelo Rio São Francisco.

A espécie *S. cerevisiae* é a principal responsável pela produção do álcool nos vinhos, por meio da fermentação alcóolica, convertendo os açúcares presentes em etanol, CO₂ e em compostos secundários responsáveis pelas características organolépticas da bebida. Linhagens indígenas selecionadas de *S. cerevisiae* para serem utilizadas como iniciadoras (“starters”) na produção de vinhos precisam possuir algumas qualidades, dentre elas, apresentar um início rápido do processo fermentativo, resistência ao etanol, entre outras. Quando a levedura é selecionada regionalmente, já se encontra adaptada àquele ambiente vinícola, podendo ser mais facilmente introduzida como iniciadora do processo fermentativo.

As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* indígenas podem ser diferenciadas pela análise de restrição do DNA mitocondrial, utilizando-se enzimas de restrição. Essa técnica permite caracterizar intraespecificamente as linhagens de *S. cerevisiae* e, com isso, identificar as diferenças a nível molecular entre as mesmas. Por meio dessa técnica pode-se diferenciar linhagens indígenas (nativas) de *S. cerevisiae* advindas da própria uva (*Vitis vinifera*) de linhagens comerciais utilizadas na produção de vinhos. Os vinhos produzidos no Vale do São Francisco são fabricados utilizando-se linhagens comerciais de origem européia ou australiana. Até o momento, não existe nenhuma linhagem regional de *S. cerevisiae* selecionada para a produção de vinhos nessa área. Nesse sentido, ao torná-la em uma levedura comercial será de grande importância para a região, pois o uso de leveduras iniciadoras torna o processo mais estável, evitando contaminações apresentadas nas fermentações que não utilizam leveduras selecionadas comerciais.

Vinhos com características próprias da região do Vale do São Francisco podem vir a apresentar um maior valor de mercado caso denotem características que o tornem competitivo no mercado de vinhos, como ocorre em países de grande tradição vinícola, que possuem produtos exclusivos de cada região. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo principal estudar o potencial de linhagens de *S. cerevisiae* isoladas do mosto fermentado de

uvas do Vale do São Francisco para a produção de vinhos. Essas linhagens poderão futuramente contribuir com as características organolépticas representativas da tipicidade dos vinhos da região.

OBJETIVOS

1 Objetivo geral

Selecionar linhagens de leveduras *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 na elaboração de vinhos.

2 Objetivos específicos

- Isolar leveduras indígenas a partir do mosto fermentado de uvas das variedades Syrah, Tempranillo, Petit Verdot, Cabernet Sauvignon e Chenin blanc colhidas na região do Vale do São Francisco;
- Identificar as leveduras presentes no mosto fermentado de uvas por meio de testes fisiológicos e moleculares;
- Caracterizar molecularmente, por meio da análise de restrição do DNA mitocondrial, as linhagens de *S. cerevisiae* isoladas a partir do mosto fermentado de uvas;
- Caracterizar os isolados de *S. cerevisiae* quanto à produção do gás H₂S;
- Realizar microfermentações com as linhagens indígenas de *S. cerevisiae* em mosto sintético, determinando-se o etanol, os compostos secundários e açúcares presentes por meio da técnica de HPLC;
- Produzir vinhos em pequena escala utilizando-se as linhagens indígenas de *S. cerevisiae* selecionadas;
- Determinar, por meio da técnica de HPLC, o etanol, os compostos secundários e açúcares presentes nos vinhos produzidos pelas linhagens indígenas de *S. cerevisiae* selecionadas;
- Determinar os compostos secundários presentes nos vinhos produzidos pelas linhagens indígenas de *S. cerevisiae* selecionadas, discriminando-se as linhagens produtoras de aromas frutados e florais por meio da técnica de GC/MS;
- Propor linhagens indígenas de *S. cerevisiae* como iniciadoras do processo fermentativo para a produção de vinhos.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Leveduras: principais características e métodos para identificação e diferenciação

Leveduras são micro-organismos eucariontes pertencentes ao Reino Fungi e presentes nos Filos Ascomycota (maioria) e Basidiomycota. As leveduras são fungos unicelulares, não-filamentosos, ovais ou esféricas, podendo se reproduzir sexualmente (sem apresentar corpo de frutificação) ou assexuadamente por brotamento ou fissão binária. As regras taxonômicas para leveduras e outros fungos são regidas de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura de Planta e Fungos (KURTZMAN et al., 2011). Segundo Kurtzman e colaboradores (2011), existem 1.500 espécies de leveduras pertencentes a 87 gêneros de ascomicetos e 62 gêneros de basidiomicetos.

As leveduras apresentam crescimento anaeróbico facultativo, podendo utilizar oxigênio ou um composto orgânico como aceptor final de elétrons. Essa é uma característica muito importante na colonização por esses micro-organismos de diversos substratos em diferentes ambientes, sendo distribuídas pela natureza com a ajuda dos insetos e pelo vento, e isoladas facilmente, por exemplo, nas superfícies de plantas, em folhas, frutos, néctares, casca de árvores, solo e no estabelecimento de relações simbióticas com animais, principalmente insetos. Poucas espécies são patogênicas para animais e humanos (KURTZMAN et al., 2011).

As leveduras estão tradicionalmente envolvidas em processos fermentativos que trazem como consequência o melhoramento ou a deterioração dos alimentos açucarados. Dados históricos comprovam o uso das leveduras desde a Antiguidade, como na produção de cerveja há 7000 anos a.C. na Suméria e na produção de vinho na Assíria há 3500 anos a.C. Os romanos já possuíam mais de 250 padarias produtoras de pães fermentados há 100 anos a.C. Esses micro-organismos apresentam uma grande diversidade de espécies com propriedades fisiológicas distintas e são utilizados em vários processos industriais (KURTZMAN; FELL, 1998; KURTZMAN et al., 2011).

Tradicionalmente, a identificação de leveduras é feita por meio das características fisiológicas, bioquímicas, morfológicas e sexuais (KURTZMAN et al., 2011). No entanto, o número de testes fenotípicos realizados para identificar uma levedura é muito grande, resultando em um processo demorado e oneroso, nem sempre se conseguindo chegar à identificação em nível de espécie. Na identificação por meio de testes fenotípicos, a reprodutibilidade pode ser questionável, uma vez que essa é dependente do estado fisiológico das células e muitas vezes não apresenta uma correlação com as identificações determinadas a

partir da análise de sequências gênicas (BARATA et al., 2012; KURTZMAN; ROBNETT, 2013).

Um marcador molecular amplamente utilizado na identificação e diferenciação de espécies de leveduras é o gene do RNA ribossomal (RNAr). Os genes codificadores do RNAr nos eucariotos estão presentes repetidas vezes no genoma da célula e cada unidade consiste de regiões codificadoras das subunidades 18S, 5.8S e 26S, e de dois espaçadores transcritos internos – *Internal Transcribed Spacers* (ITS 1 e ITS 2) – que separam essas regiões. Cada unidade do RNAr é separada por um espaçador intergênico – *Inter Genetic Spacers* (IGS). O gene do RNAr apresenta em sua sequência variações que podem ser usadas em estudos de sistemática para diferentes níveis taxonômicos (KURTZMAN; FELL, 2006).

A grande disponibilidade de sequências em bancos de dados de DNA, principalmente para a região D1/D2 da subunidade maior do gene 26S do RNAr, faz com que essa técnica seja útil e muito utilizada na identificação de leveduras (KURTZMAN; ROBNETT, 1998; GRONDIN et al., 2015). Geralmente isolados da mesma espécie de levedura apresentam identidade superior a 99% nestas sequencias. No entanto, para se ter um conhecimento mais preciso das relações filogenéticas das espécies de leveduras são necessárias análises multi-gênicas, ou mesmo comparações de genoma inteiro (KURTZMAN; ROBNETT, 2013).

Uma técnica amplamente utilizada na biologia molecular para diferenciar linhagens vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* é a restrição do DNA mitocondrial utilizando-se a técnica de polimorfismo por RFLP (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Essa técnica consiste em utilizar enzimas de restrição (endonucleases) que cortam o DNA em locais específicos e, conseqüentemente, são formados perfis (fragmentos) de bandas de DNA distintas para cada linhagem de levedura. De acordo com Guillamón e colaboradores (1994), as enzimas mais adequadas para diferenciar as linhagens de *S. cerevisiae* são *HinfI* e *HaeIII*.

O DNA mitocondrial possui um alto conteúdo de bases AT (75%), e, em contrapartida, o DNA nuclear apresenta uma alta proporção de sítios GC. Fazendo-se uso de enzimas de restrição ricas em GC para a clivagem do DNA genômico, o DNA nuclear será quebrado completamente devido à alta proporção de sítios GC que serão clivados pelas enzimas de restrição, enquanto o DNA mitocondrial será clivado em fragmentos longos de vários tamanhos, possibilitando, assim, a visualização de polimorfismos intraespecíficos de linhagens de *S. cerevisiae* sem a necessidade de se isolar o DNA mitocondrial (QUEROL et al., 1992a).

O DNA mitocondrial de *S. cerevisiae* é pequeno, podendo apresentar um tamanho de 60 a 80kb; é altamente polimórfico (dependendo da linhagem) e estável (sofre poucas mutações) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; CARRASCOSA et al., 2011). Diversos autores vêm utilizando esta técnica de RFLP-mtDNA para diferenciar linhagens de *S. cerevisiae* vínicas (QUEROL et al., 1992a, QUEROL et al., 1992b; QUEROL et al., 1994; GUILLAMÓN et al., 1996; COMI et al., 2000; CLEMENTE-JIMENEZ et al., 2004; SCHULLER et al., 2004; SCHULLER et al., 2005; MERCADO et al., 2007; NIKOLAOU et al., 2007; CAPECE et al., 2010; MAQUEDA et al., 2010; MERCADO et al., 2011; CAPECE et al., 2012; CAPECE et al., 2013a; ORTIZ et al., 2013). Geralmente, esses estudos mostram uma grande diversidade de linhagens de *S. cerevisiae* associadas com processos de fermentação espontânea na produção de vinhos e outras bebidas. Essa técnica também permite acompanhar a permanência de linhagens selecionadas de *S. cerevisiae* durante os processos de fermentação (MERCADO et al., 2011; CAPECE et al., 2012; CAPECE et al., 2013a).

1.2 Leveduras vínicas

A diversidade microbiana existente no processo de conversão do mosto de uva em vinho é um processo bioquímico complexo que envolve interações entre leveduras, fungos filamentosos e bactérias, todos esses contribuindo na composição química e qualidade da bebida. Dentre esses micro-organismos, as leveduras são os principais responsáveis pela fermentação alcoólica (FLEET, 2007; FUGELSANG; EDWARDS, 2007).

As leveduras podem ser encontradas na superfície da videira, distribuídas de modo irregular, sendo isoladas em pequenas quantidades a partir das folhas, caule e uvas verdes, e colonizando a casca da uva durante a maturação. Por meio de observações utilizando-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura foi possível a visualização de leveduras presentes em cascas de uvas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

As leveduras vínicas são raramente encontradas nas flores de uva, mas multiplicam-se, preferencialmente, em exsudatos liberados das microlesões em zonas situadas ao redor do aparelho estomático. Antes da colheita, o número de leveduras presentes na baga da uva é de 10^3 a 10^5 UFC/g, a depender da localização geográfica, das condições climáticas, sanitárias e tratamentos com pesticidas; após a colheita, transporte e esmagamento, esse número se eleva para aproximadamente 10^6 células/mL de mosto, sendo o aumento da concentração de açúcares na matéria-prima um dos fatores contribuintes para essa elevação, sendo os principais açúcares presentes na uva e no vinho a glicose e a frutose. No entanto, quanto mais

as uvas são tratadas com inseticidas e fungicidas, maior a diminuição da microbiota indígena (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

As leveduras envolvidas na produção do vinho podem ser oriundas, além da vinha, de superfícies dos equipamentos da adega que são expostos, a cada safra, por bilhões de células de leveduras, sendo facilmente colonizadas e contribuindo para o desenvolvimento de uma comunidade residente no ambiente de vinificação. Um outro fato também deve-se considerar é o carregamento das mesmas pelos insetos para esses locais de vinificação (ROSINI, 1984; FLEET; HEARD, 1993; MARTINI et al., 1996; NAUMOV, 1996; CONSTANTÍ et al., 1997; MORTIMER; POLSINELLI, 1999). De acordo com Pretorius (2000), a origem das leveduras no vinhedo ou na adega depende de diversos fatores como: condições climáticas (temperatura e pluviosidade), a localização geográfica da vinha, a quantidade de SO₂ utilizado no mosto, aplicações de antifúngicos, a técnica de colheita, a variedade da uva, a idade da vinha, e o tipo de solo.

Diversos trabalhos têm relatado o isolamento a partir do mosto da uva, de uma variedade de espécies de leveduras dos gêneros *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), *Pichia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Issatchenkia*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Meyerozyma*, *Wickerhamomyces*, *Torulaspora*, *Dekkera* e *Schizosaccharomyces* (FLEET, 2003; DI MARO et al., 2007; FUGELSANG; FLEET, 2008; URSO et al., 2008; BARRAJÓN et al., 2009; CLAVIJO et al., 2010; ESTEVE-ZARZOSO et al., 2010; LI et al., 2010; SETTANNI et al., 2012; BEZERRA-BUSSOLI et al., 2013; CAPECE et al., 2013b; ORTIZ et al., 2013; TRISTEZZA et al., 2013; WANG; LIU, 2013; PÉREZ-MARTÍN et al., 2014; PONZZES-GOMES et al., 2014; SUN et al., 2014; SUN; LIU, 2014). Normalmente, essas leveduras são consideradas como transitórias durante o processo de fermentação, ou seja, a maioria delas irá desaparecer durante o processo quando a concentração de etanol aumenta, por serem sensíveis a esse composto (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Na superfície das uvas, o número de espécies de levedura é limitado, estando presentes espécies de metabolismo oxidativo do gênero *Rhodotorula* e algumas espécies sensíveis ao álcool, sendo a mais comumente encontrada a levedura apiculada *Kloeckera apiculata* (= *Hanseniaspora uvarum*). Essa espécie compreende até 99% dos isolados de leveduras em determinadas amostras de uva (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Outras espécies também são encontradas em proporções menores nas superfícies das uvas como: *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida famata*, *C. stellata* (= *Starmerella bacillaris*), *C. zeylanoides*,

Cryptococcus uniguttulatus, *Cr. ater*, *Cr. laurentii*, *Pichia membranifaciens*, *P. fermentans*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Aureobasidium pullulans* (fungo leveduriforme) e *S. cerevisiae*. Entretanto, em condições de vinificação espontâneas, esse pequeno número populacional na uva de *S. cerevisiae* aumenta rapidamente, sendo que esta espécie domina do meio à fase final do processo de fermentação, à medida que a concentração de etanol aumenta no mosto (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

As espécies de leveduras encontradas numa maior concentração no início da fermentação e na superfície das uvas praticamente desaparecem da metade até o final do processo fermentativo. Nas primeiras 20 horas, as contagens populacionais de *S. cerevisiae* estão próximas às das demais espécies. No entanto, depois de 3 a 4 dias de fermentação, *S. cerevisiae* predomina, sendo a principal responsável pela fermentação alcoólica (SABATE et al., 2002; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Nas superfícies dos equipamentos da adega, as linhagens de *S. cerevisiae* são muito mais abundantes do que nas uvas ou vinhedo (ROSINI, 1984; MARTINI et al., 1996; CONSTANTÍ et al., 1997).

Diversos trabalhos têm isolado e identificado leveduras indígenas dos vinhos ou das uvas visando à melhoria e conhecimento de suas propriedades vínicas. Sun e colaboradores (2014) isolaram e identificaram leveduras indígenas de cinco variedades diferentes de uva em Xiangning, na China. Os autores encontraram oito espécies distribuídas em sete gêneros, identificadas por meio do sequenciamento dos domínios D1/D2 da subunidade 26S do rDNA. Dentre essas, as espécies predominantes foram *H. uvarum* e *S. cerevisiae*. Capece e colaboradores (2013b) analisaram vinhos de cultura única e de cultura mista produzidos por isolados de *S. cerevisiae* indígenas isoladas de fermentações espontâneas de uvas colhidas em um vinhedo na região da Toscana, na Itália. A partir do total de 160 isolados caracterizados pela amplificação por PCR da região inter-delta, seis linhagens diferentes foram encontradas. Linhagens representativas dos seis perfis encontrados foram utilizadas para a produção de vinhos e foi constatado que os vinhos produzidos por monoculturas (exceto o vinho da linhagem A) e culturas mistas se comportaram diferentes quanto aos compostos secundários analisados.

Settanni e colaboradores (2012) estudaram a ecologia de leveduras associadas com a fermentação espontânea dos vinhos da variedade “Grillo” na cidade de Sicília, Itália. As leveduras foram identificadas por meio da análise por RFLP do gene do RNAr, subunidades 5.8S e 26S, e sequenciamento do domínio D1/D2 da subunidade 26S do gene do RNAr. Os autores encontraram 14 espécies pertencentes a 10 gêneros. Cinquenta e uma linhagens de *S.*

cerevisiae foram diferenciadas por meio de PCR multiplex ou por amplificação da região inter-delta. De acordo com os parâmetros fermentativos analisados pelos autores, 14 linhagens de *S. cerevisiae* foram selecionadas para serem iniciadoras nas fermentações dos mostos de uvas, e três dessas foram consideradas apropriadas para a utilização na produção de vinhos. Liang e colaboradores (2013) estudaram a melhoria da qualidade e aroma de vinhos por meio de microfermentações de uvas da variedade Cabernet Sauvignon. Os autores utilizaram 12 linhagens indígenas de *S. cerevisiae* isoladas a partir de quatro regiões vinícolas da China. Os resultados da avaliação sensorial e composições químicas dos vinhos mostraram que uma linhagem foi a melhor produtora de ésteres etílicos e isoamílicos, caracterizados por aroma frutado, tendo a maior pontuação para a complexidade cor, adstringência e sabor. Trabalhos como os citados acima corroboram a importância do isolamento de linhagens indígenas regionais para a produção de vinhos.

1.3 Linhagens vnicas de *Saccharomyces cerevisiae*

As linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas em vinificação são diplóides, aneuplóides ou poliplóides. Os estados aneuplóide e poliplóide de *S. cerevisiae* conferem vantagens às leveduras como uma adaptação às mudanças ambientais e o aumento da quantidade de alguns genes importantes para a fermentação (BAKALINSKY; SNOW, 1990; BARRE et al., 1992; CODÓN; BENÍTEZ, 1995; SALMON, 1997; PRETORIUS, 2000, RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Saccharomyces cerevisiae é uma espécie capaz de converter rapidamente açúcares em etanol e dióxido de carbono, sob condições tanto anaeróbias (ausência de oxigênio) e quanto aeróbias (presença de oxigênio). O que irá ditar qual via essa levedura irá utilizar será a quantidade de açúcar presente no meio. Mesmo em condições aeróbias *S. cerevisiae* pode realizar a fermentação alcoólica, contanto que o nível de glicose no meio esteja elevado. Esse é um fenômeno conhecido como repressão catabólica ou efeito Crabtree, e as leveduras que expressam essa característica são chamadas de leveduras Crabtree-positivas. As leveduras que não são capazes de realizar a fermentação alcoólica sob essas mesmas condições são chamadas de Crabtree-negativas (DE DEKEN, 1966, CARLILE et al., 2001, RIBÉREAU-GAYON et al., 2006, DASHKO et al., 2014).

A utilização de linhagens indígenas de *S. cerevisiae* na produção de vinhos como leveduras iniciadoras (“starters”) da fermentação alcoólica é cada vez mais explorada pelos produtores de vinho que buscam dar tipicidade às suas bebidas (SETTANNI et al., 2012;

SUZZI et al., 2012; CAPECE et al., 2013a; PERRONE et al., 2013; ORTIZ et al., 2013; TRISTEZZA et al., 2013; WANG; LIU, 2013; SUN et al., 2014; TOFALOET al., 2014). Essas linhagens indígenas mostram uma maior adaptação ao meio e às condições particulares de fermentação, suportando os estresses presentes (temperatura, alta concentração de etanol, esgotamento de açúcar, baixo pH, anaerobiose, quantidade limitada de nitrogênio, etc). Por meio do isolamento e seleção dessas leveduras, pode-se chegar a vinhos com características próprias da região geográfica estudada, apresentando aromas e sabores típicos. Diversos fatores interferem na qualidade das bebidas alcoólicas fermentadas, tais 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 (ZUZUARREGUI et al., 2006; FLEET, 2008).

A utilização de linhagens iniciadoras selecionadas no processo fermentativo apresenta algumas vantagens, tais como: início mais rápido do processo; diminuição dos riscos de contaminação apresentados pela fermentação espontânea; menor competição por nutrientes essenciais entre diferentes linhagens; maior rendimento e qualidade do produto resultante (FLEET; LAFON-LAFOURCADE; RIBÉREAU-GAYON, 1984; SANNI; LONNER, 1993). Entretanto, para serem utilizadas como iniciadoras, essas linhagens precisam denotar algumas características fermentativas importantes como um rápido início do processo fermentativo, elevada resistência ao etanol, osmotolerância, alta estabilidade genética, reduzida formação de espuma, tolerância ao SO₂, eficiência na habilidade de fermentar açúcares em concentrações em torno de 20% (p/v), produção de quantidades adequadas de glicerol e produção de baixos níveis de sulfeto de hidrogênio (H₂S) (PRETORIUS, 2000; CARRASCO et al., 2001; BARATA et al., 2012).

As culturas iniciadoras são adicionadas em elevadas concentrações para que consigam se sobrepor às demais leveduras presentes, advindas da microbiota indígena, e assim conseguir dominar o processo. No entanto, estudos mostram que a microbiota transiente tem uma participação importante no “flavour” do vinho contribuindo com a composição química e produção de compostos aromáticos nas primeiras etapas da fermentação (BARROS LOPES et al., 1996; FLEET, 2003; GARDE-CERDÁN; ANCÍN-AZPILICUETA, 2006; DI MARO et al., 2007; MOREIRA et al., 2008). Algumas dessas espécies transientes podem também contribuir diretamente para a qualidade da bebida. Como exemplo, em fermentações conduzidas a baixas temperaturas (temperaturas menores que 15-20°C) espécies de *Hanseniaspora* e *Candida* apresentam uma grande contribuição e um impacto maior no sabor

do vinho por produzirem em baixas temperaturas maiores concentrações de ésteres e acetaldeídos. Nessas condições, essas espécies podem ter um comportamento semelhante a *S. cerevisiae* e outras espécies predominantes no final da fermentação por serem tolerantes a altas concentrações de etanol (ERTEN, 2002; MILLS et al., 2002). Para cada tipo de vinho que deseja-se produzir é utilizada um tipo de linhagem iniciadora específica para aquele processo de vinificação, pois algumas linhagens de *S. cerevisiae* se comportam melhores em baixas temperaturas (específica para vinhos brancos) e outras para elevadas temperaturas (específica para vinhos tintos).

1.4 Produção do gás sulfeto de hidrogênio (H₂S)

Além das características atribuídas a uma levedura para que essa possa ser utilizada como iniciadora de um determinado processo fermentativo, uma produção não elevada de H₂S é também desejável. Uma concentração elevada deste composto volátil é prejudicial à qualidade do vinho, pois ao ser formado durante a fermentação, o mesmo produz um aroma característico de ovo podre e putrefação. Além de ser altamente reativo, o sulfeto de hidrogênio funciona como um precursor para o desenvolvimento de outros compostos com aroma de enxofre, como sulfeto de dimetil, sulfeto de dietil e dissulfeto de dimetil, que conferem aromas de repolho cozido, legumes cozidos, cebola, alho e borracha queimada, características negativas ao vinho. O H₂S possui um limiar de reconhecimento inferior a 1 µg/L (RAPP et al., 1992; RAUHUT, 1993; MESTRES et al., 2000; SWIEGERS et al., 2005; LANDAUD et al., 2008).

O ponto de ebulição desse gás é relativamente baixo (<90°C), sendo a maior parte volatilizada por trasfega simples e aeração (MESTRES et al., 2000; MOREIRA et al., 2002). Contudo, essa aeração é capaz de formar no vinho etil mercaptano e outros compostos voláteis indesejáveis, sendo difíceis de serem removidos (THOUKIS; STERN, 1962; LINDERHOLM et al., 2010). Em contrapartida, níveis baixos desse gás contribuem para o “flavour” da levedura ou “bouquet” da fermentação em vinhos jovens (KÖNIG et al., 2009).

Existem diversos fatores que pode influenciar na produção de H₂S, como a deficiência de nitrogênio no mosto de fermentação e a degradação do aminoácido cisteína em sulfureto pela enzima cisteína desulfidrase (TOKUYAMA et al., 1973; VOS; GRAY, 1979; STRATFORD; ROSE, 1985; RAUHUT, 1993; GUIDICI; KUNKEE, 1994; JIRANEK et al., 1995a; BELOQUI, 1998). Isso pode levar à formação de aromas sulfurosos indesejáveis (“off-flavour”) com uma fermentação lenta ou parada. Entretanto, níveis excessivos de

nitrogênio também permitem a formação de compostos de enxofre indesejáveis. Assim sendo, o excesso e a deficiência de nitrogênio influenciam na liberação do gás H₂S, e, dessa maneira, o ajuste dos níveis iniciais de nitrogênio é de grande importância quando se quer produzir um vinho com aromas de qualidade (BISSON, 1991; BELL; HENSCHKE, 2005; MENDES-FERREIRA et al., 2009).

1.5 Vinho

De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 1988; 2004), o vinho é exclusivamente a bebida resultante da fermentação alcoólica completa ou parcial da uva fresca, esmagada ou não, ou do mosto simples ou virgem, com um conteúdo de álcool adquirido mínimo de 7% (v/v à 20°C). Os principais açúcares do vinho são a glicose e frutose, e com a quebra irão produzir o etanol e CO₂, entre outros compostos. Essa bebida pode ser classificada em:

- **Quanto à cor:** vinho tinto, rosado (rosé), e vinho branco.
- **Quanto à classe:** vinho de mesa, vinho leve, vinho fino (proveniente exclusivamente de variedades *Vitis vinifera*) ou VCP (Vinho de Qualidade Preferencial), vinho espumante, vinho frisanter, vinho gaseificado, vinho licoroso e vinho composto.
- **Quanto ao teor de açúcar** (expresso em g/L de glicose): **a) Para os vinhos leves, de mesa, frisantes e finos:** seco (com até 4 g/L de açúcar), demi-sec ou meio seco (com teor superior a 4 e até 25 g/L de açúcar), suave ou doce (com teor superior a 25 e até 80 g/L de açúcar); **b) Para os vinhos espumantes naturais ou gaseificados:** Nature (com até 3 g/L de açúcar), extra-brut (com teor superior a 3 e até 8 g/L de açúcar), brut (com teor superior a 8 e até 15 g/L de açúcar), sec ou Seco (com teor superior a 15 e até 20 g/L de açúcar), demi-sec, meio-doce ou meio-seco (com teor superior a 20 e até 60 g/L de açúcar), doce (com teor superior a 60 g/L de açúcar); **c) Para os vinhos licorosos:** seco (com até 20 g/L de açúcar), doce (com teor superior a 20 g/L de açúcar); **d) Para os vinhos compostos:** seco ou *dry* (com até 40 g/L de açúcar), meio-seco ou meio-doce (com teor superior a 40 e até 80 g/L açúcar), doce (com teor superior a 80 g/L de açúcar).

Tabela 1 – Parâmetros fermentativos encontrados nos vinhos de acordo com a Legislação brasileira (BRASIL, 1988).

Vinho de mesa (a 20 °C)	Mínimo	Máximo
Álcool etílico %(v/v)	8,6	14
Acidez total (meq/L de ácido tartárico)	55 (= 4,125 g/L)	130 (= 9,75 g/L)
Acidez volátil corrigida (meq/L de ácido acético)	.-	20 (= 1,2 g/L)
Sulfatos totais em sulfato de potássio (g/L)	.-	1
Anidrido Sulfuroso total (g/L)	.-	0,35
Cloretos totais, em cloreto de sódio, (g/L)	.-	0,2
Álcool Metílico (g/L)	.-	0,35

O processo de produção de vinho tinto e vinho branco (Figura 1) é diferente, principalmente com relação à temperatura da fermentação alcoólica, entretanto coincide em algumas etapas (PRETORIUS; HOJ, 2005; SANTOS, 2008). A vinificação para tinto ocorre nas seguintes etapas: **1) Colheita da uva**; **2) Desengaçamento** (separa as bagas dos engaços) **e esmagamento** (apenas para romper a casca, liberando parte do suco); **3) Sulfitagem** (adição de anidrido sulfuroso que bloqueia a ação de bactérias e é anti-oxidante); **4) Fermentação alcoólica** (etapa que ocorre entre 24-32°C, onde as leveduras selvagens ou leveduras industriais selecionadas irão produzir CO₂, etanol e outros compostos) **e Maceração** (etapa no qual o mosto-vinho fica em contato com o “chapéu” - partes sólidas do mosto na parte superior do tanque - para extração dos corantes, polifenóis, aromas e sabor); **4.1) Remontagem** (etapa realizada três a quatro vezes ao dia, onde ocorre a transferência do mosto-vinho que está em contato com o chapéu para a parte inferior do tanque e ocorrer uma homogeneização na extração dos compostos durante a maceração e fermentação); **4.2) Descuba** (etapa seguinte ao final da fermentação alcoólica onde separa a parte sólida da parte líquida do mosto-vinho; o vinho que flui livremente é denominado de “vinho superior” sendo adequado para elaborar vinhos finos, e transferido para outro tanque); **5) Prensagem** (etapa que as partes sólidas, separadas na descuba, são prensadas e produzem um vinho inferior, chamado de “vinho de prensa”, utilizado para vinhos comuns ou geralmente destilados); **6) Fermentação malolática** (etapa em que a ação de bactérias presentes no vinho superior ou inoculadas irão transformar o ácido málico do vinho num ácido mais suave, o ácido láctico; nessa etapa também começa um processo de decantação de impurezas); **6.1) Transfega** (etapa que transfere o vinho para outro recipiente, no final da fermentação malolática, separando-o

da borra no fundo do tanque); **7) Sulfitagem** (etapa que adiciona o anidrido sulfuroso para deter a ação das bactérias); **8) Clarificação** (etapa que clarifica o vinho pela decantação, tornando-o mais translúcido); **9) Maturação** (etapa realizada em barricas de carvalho que busca o amaciamento, pela oxidação lenta do vinho, a concentração, através da evaporação do vinho, e a troca química entre o vinho e a madeira para extração dos compostos presentes no carvalho); **10) Estabilização e Filtração** (etapa que provoca a formação, precipitação e eliminação de cristais de tartarato ácido de potássio por meio da filtração); **11) Engarrafamento** (etapa no qual o vinho é engarrafado em máquinas especiais que impedem o contato com o ar, evitando oxidações e contaminações). O processo de vinificação em branco realiza as seguintes etapas: **1) Colheita da uva**; **2) Desengaçamento e esmagamento** (sem romper as bagas, só para liberar parte do suco); **3) Sulfitagem**; **4) Maceração** (etapa facultativa, e quando há, é uma etapa curta e antes da prensagem); **5) Prensagem** (suficiente para extrair o suco, mas não esmaga a casca e nem as sementes; etapa que serve para separar também as partes sólidas); **6) Fermentação alcoólica** (etapa que ocorre entre 15-18°C, podendo ocorrer em temperaturas mais baixas); **7) Fermentação malolática** (etapa facultativa para vinhos brancos); **7.1) Transfega**; **8) Sulfitagem**; **9) Clarificação**; **10) Maturação**; **11) Estabilização e Filtração**; **12) Engarrafamento**. Na vinificação de tinto e de branco pode ocorrer uma etapa chamada de Chaptalização na qual consiste em adicionar açúcar (sacarose) aos mostos deficientes do mesmo, antes da fermentação alcoólica, para que o vinho atinja o teor alcoólico mínimo necessário a sua conservação. Os vinhos brancos podem ser elaborados por uvas brancas e uvas tintas (que não sejam tintureiras), mas vinhos tintos só podem ser elaborados por uvas tintas.

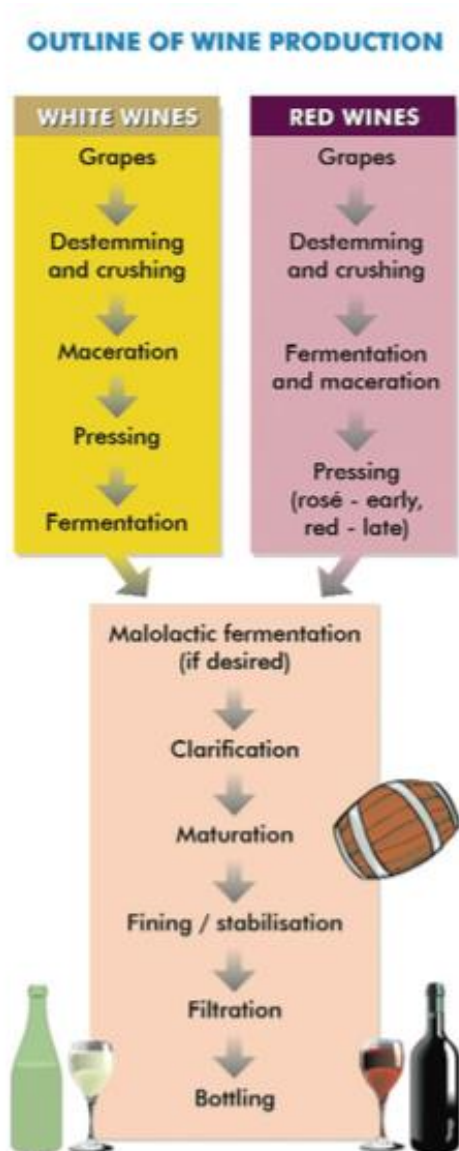


Figura 1. Processo de vinificação de vinho branco e vinho tinto.

Fonte: Pretorius e Hoj (2005)

O “flavour” é provavelmente o fator mais importante na contribuição da qualidade do vinho, sendo resultante da interação de componentes químicos com os sentidos do olfato e paladar. Os compostos aromáticos (olfato) são os compostos voláteis, responsáveis pelo odor, e os compostos que causam a sensação gustativa (paladar) são os compostos não voláteis (RAPP et al., 1992).

O aroma é determinado por diversos compostos voláteis, cujas concentrações variam entre 10^{-1} e 10^{-10} g/kg (RAPP; MANDERY, 1986). A origem dos aromas no vinho provém de três fontes diferentes: aroma primário ou aroma varietal, determinado pela variedade de uva; aroma secundário ou aroma da fermentação, formado durante o processo fermentativo; e

aroma terciário ou “bouquet”, resultante da transformação de aromas durante o envelhecimento (CARRASCOSA et al., 2011). Mais de 1000 compostos voláteis já foram identificados, e desses, mais de 400 são produzidos durante a fermentação pelas leveduras (NYKÄNEN, 1986). Os compostos voláteis do metabolismo das leveduras produzidos em maior quantidade são etanol, glicerol e dióxido de carbono; entretanto, esses desempenham uma pequena contribuição no aroma do vinho. Por outro lado, ácidos orgânicos, álcoois superiores, ésteres, e em menor grau acetaldeído constituem o principal grupo de compostos que formam o aroma do vinho (RAPP; VERSINI, 1991). Contudo, quando presentes em concentrações excessivas, esses compostos podem também ser considerados indesejáveis.

Uma forma de separar, identificar e quantificar os compostos voláteis do vinho é por meio da Cromatografia Gasosa (GC) acoplada com a Espectrometria de Massa (MS), antecedida por uma extração, que pode ser realizada pela Microextração em Fase Sólida (SPME). A SPME é uma técnica que prepara a amostra sem o uso de solvente, extraindo e concentrando os compostos voláteis e não voláteis de líquidos ou *headspace* (espaço formado pela amostra acondicionada em um sistema fechado) em uma fibra de sílica fundida recoberta por polímero, um sólido adsorvente ou uma combinação dos dois, numa única etapa de extração (ALPENDURATA, 2000; KATAOKA et al., 2000; ANTALICK et al., 2010), e diversas pesquisas vêm utilizando esta técnica de GC/MS e SPME-GC/MS para a análise dos compostos voláteis de vinhos (BONINO et al., 2003; CAPECE et al., 2013b; LIANG et al., 2013; CALIARI et al., 2015; GUPTA et al., 2015).

Outros compostos que influenciam nas características sensoriais dos vinhos são os compostos fenólicos. Esses compostos podem ser encontrados nas uvas e nos vinhos, contribuindo principalmente na cor, no “flavour” e na adstringência, havendo uma maior concentração em vinhos tintos do que em brancos, fato esse justificado pelo processo diferenciado de elaboração dos mesmos. Na produção do vinho tinto, a fermentação alcoólica ocorre com a casca (etapa chamada de maceração, ocorrendo em paralelo com a fermentação alcoólica) e uma das funções é a extração dos compostos fenólicos; no vinho branco a fermentação alcoólica ocorre sem a casca, mas quando há maceração (etapa facultativa) é uma etapa curta e antes da fermentação alcoólica. Um outro fator que diminui a concentração de compostos fenólicos é a presença de anticioninas (composto fenólico responsável pela pigmentação das uvas tintas), ausente nas uvas brancas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2000; MAMEDE; PASTORE, 2004).

Os compostos fenólicos são divididos em duas classes: flavonóides (flavanóis, flavonóis, antocianinas) e não-flavonóides (estilbenos, derivados de ácido cinâmico e benzoico, e uma larga variedade de taninos). Os compostos fenólicos são substâncias produzidas pelas plantas principalmente para se protegerem num momento de estresse contra agentes microbianos fitopatogênicos, contra efeitos nocivos da exposição prolongada à luz solar, escassez hídrica e ataques de herbívoros (PIETTA, 2000; SILVA et al., 2008; CHAVES et al., 2010; VULETA et al., 2010).

Na videira, os compostos fenólicos são encontrados em maior concentração na película e mosto da uva, e estão também presentes em seus derivados, como o suco e o vinho. O vinho contém mais de 500 compostos fenólicos, alguns provenientes diretamente da uva e outros resultantes da ação das leveduras durante o processo de fermentação do mosto. A maioria desses compostos é encontrada em baixas concentrações ($\mu\text{g/mL}$), e raramente em concentrações acima de 100 mg/L (WIEL et al., 2001). A concentração desses compostos fenólicos depende fortemente da variedade de uva e do processo de vinificação (SOLEAS et al., 1997). A concentração dos flavonóides extraídos durante a vinificação é influenciada por diversos fatores como a temperatura, a homogeneização do mosto, os parâmetros da cuba de fermentação, a duração da maceração com a casca, a concentração de etanol, a concentração de SO_2 adicionada, a linhagem de levedura, o pH e a concentração de enzimas pectolíticas adicionada (STRATIL, et al., 2008).

A capacidade antioxidante dos vinhos é medida geralmente pelo índice de polifenóis totais e a variação desse índice corresponde aos diversos polifenóis presentes (MAMEDE, PASTORE, 2004). Entretanto, um maior conteúdo dessas substâncias não implica necessariamente em uma atividade antioxidante mais elevada. O que irá determinar a atividade antioxidante será a concentração de cada composto fenólico presente, sendo que os flavonóides, as proantocianidinas (taninos condensados) e as antocianinas são os que apresentam maior potencial antioxidante (FRANKEL et al., 1995; RICE-EVANS; MILLER, 1996; RIVERO-PÉREZ et al., 2007). Os compostos polifenóis protegem o sistema biológico contra radicais livres, apresentando uma capacidade quelante de metais com característica catalítica, como o ferro e o cobre (YANG et al., 2001). Pesquisas têm mostrado que os compostos fenólicos do vinho são melhores antioxidantes do que as vitaminas C e E. Além disso, atuam na prevenção de enfermidades cardiovasculares, circulatórias, cancerígenas e neurológicas (TSUDA et al., 1994; RICE-EVANS et al., 1997; SCHRAMM; YGERMAN,

1998; LAPIDOT et al., 1999; LEIGHTON, URQUIAGA, 2000; ISHIGE et al., 2001; WANG; MAZZA, 2002; KATSUBE et al., 2003; IACOPINI et al., 2008).

1.6 Vale do Submédio do Rio São Francisco

A região do Vale do São Francisco (VSF) corresponde à região margeada pelo Rio São Francisco e afluentes, estando localizada nos Estados de Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Sergipe e Alagoas. Entretanto, a região do Submédio do São Francisco está localizada apenas no norte da Bahia e região de Pernambuco (nordeste do Brasil) (Figura 2), destacando-se neste local as cidades de Petrolina (PE), Santa Maria da Boa Vista (PE), Lagoa Grande (PE) e Casa Nova (BA).

O Submédio do Rio São Francisco vem recebendo grandes investimentos por ser uma região fértil e promissora, principalmente para a produção de uvas e vinhos. Essa atividade é conduzida numa região de clima semiárido e vem sendo desenvolvida desde os anos de 1980 (TONIETTO; TEIXEIRA, 2004). A cultura da uva (*Vitis vinifera* L.) utilizada nos processos de produção dos vinhos no nordeste brasileiro no Submédio do Rio São Francisco vem se desenvolvendo rapidamente por vários motivos, dentre esses, grandes investimentos, irrigação (disponibilidade de água do Rio São Francisco), e o surgimento de fazendas experimentais associadas à Embrapa Semiárido. Todo esse investimento possibilita um crescente aumento do número de empregos na região, além de conferir à mesma o título de 2º maior pólo do país na produção de vinhos, espumantes e sucos naturais de uva, perdendo apenas para a região Gaúcha, onde a tradição e o plantio são bastante antigos.

A região do VSF é responsável por 99% da uva de mesa exportada pelo Brasil e pela produção de 7 milhões de litros de vinho por ano, consistindo, assim, em um modelo de desenvolvimento para o nordeste do país. No Brasil, cerca de 85% do total de vinhos produzidos provém das uvas da variedade *Vitis labrusca*, correspondendo a 300 milhões de litros por ano, e à apenas 15% das uvas da variedade *Vitis vinifera* L., o que corresponde a 40 milhões de litros por ano (PEREIRA et al., 2011). Essa região é caracterizada por ser a única no mundo que produz duas safras e meia de uva por ano; suas uvas acumulam bem mais açúcares, reduzem mais a acidez, além de, pela rapidez na maturação, podem, não chegar a uma maturação fenólica completa, comparadas às outras regiões, como algumas dessas características podem ser observadas nos trabalhos de Espindola et al. (2008), Miele et al. (2010) e De Oliveira et al. (2011). Entretanto, para as regiões tradicionais na produção de vinho (Europa, América do Sul e do Norte, África do Sul e Oceania) apenas uma colheita por

ano é obtida, uma vez que essas áreas estão situadas em zonas de clima temperado e enfrentam baixas temperaturas no inverno (REYNIER, 2003). Nos estudos de Araújo e colaboradores (2009; 2012) analisaram a composição físico-química dos vinhos do Vale do São Francisco produzidos por uvas colhidas em safras diferentes no mesmo ano e constataram que houve diferenças nas análises de ambas as safras no qual utilizou a mesma variedade de uva.

As uvas da região Submédio do Rio São Francisco são as únicas cultivadas entre os paralelos 8° e 9° de latitude Sul, as mais baixas latitudes na vinicultura mundial, com altitude média de 400 metros e em áreas planas, na Caatinga do sertão nordestino (SANTOS, 2008). O período vegetativo dessas uvas é manejado para coincidir com o período seco, o que reduz o problema de doenças fitossanitárias, em especial as fúngicas (TAVARES et al., 2004). A vinicultura pernambucana/bahiana já detém 15% do mercado nacional e emprega diretamente 30 mil pessoas (PEREIRA et al., 2011; CODEVASF, 2014).



Figura 2. Bacia do Rio São Francisco com destaque para suas subdivisões por região.

Fonte: IPHAN <<http://portal.iphan.gov.br>>

O Vale do Rio São Francisco possui peculiaridades como o clima, classificado como tropical semiárido, com temperatura média anual em torno de 26°C, pluviosidade de aproximadamente 500 mm, concentrada entre os meses de janeiro a abril, e 330 m de altitude. Além das características já citadas, é possível realizar o escalonamento da produção ao longo do ano, o que reduz os investimentos em termos de infraestrutura para a elaboração dos vinhos. Também é possível a escolha dos períodos do ano mais favoráveis para que se consigam uvas e vinhos de melhor qualidade. A irrigação a partir da água do Rio São Francisco, de excelente qualidade, é o fator principal que permite o desenvolvimento das videiras durante todo o ano, possibilitando a decisão de quando se iniciar uma nova safra e prever a data da colheita (TEIXEIRA et al., 2007; VINHO VASF, 2007).

Em fevereiro de 2006, na Unidade da Embrapa Semiárido em Petrolina (PE) foi inaugurado o Laboratório de Enologia, dotado de tecnologia para ser considerado um dos mais modernos do País (CODESVASF, 2014). O principal objetivo com a criação desse laboratório foi empreender análises dos vinhos da região com o monitoramento da qualidade, e a certificação da procedência do que é produzido no Vale do São Francisco. O investimento inicial da FINEP e da Embrapa foi de R\$1,4 milhão. No mesmo ano, foi assinado um convênio entre as instituições, no valor de R\$ 795 mil, para implantação de vinhedos que pudessem servir de base para selecionar e divulgar novas variedades de uva, permitindo o desenvolvimento da pesquisa de novos vinhos com características peculiares da região.

Diversas leveduras comerciais são utilizadas no Vale do São Francisco, sendo as mais representativas: *S. cerevisiae* AWRI 796 da marca Maurivin; *S. cerevisiae* var. *bayanus* da marca Lalvin R2; *S. cerevisiae* (var. *bayanus*) da marca Mycoferm Crio SP; *S. cerevisiae* (var. *bayanus*) PDM da marca Maurivin; *S. cerevisiae* (var. *bayanus*) da marca Mycoferm Cru 05; *S. cerevisiae* da marca Fermol Rouge (AEB). As principais características dessas linhagens de leveduras são descritas a seguir. AWRI 796 é uma levedura produzida pela marca australiana Maurivin, sendo o primeiro isolado de *S. cerevisiae* a ser comercializado na forma seca ativa na África do Sul. AWRI 796 produz baixos níveis de compostos de aroma e sabor, e é considerada razoavelmente neutra, altamente desejável para a fermentação de vinhos distintamente varietais, para os quais o enologista deseja pouca ou nenhuma interferência a partir da linhagem de levedura no caráter varietal natural das uvas. Seu valor comercial é de \$ 23,00 (500g) (MAURIVIN, 2015; TCW EQUIPMENT, 2015). PDM (Maurivin) é uma linhagem de *S. cerevisiae* que produz baixos a moderados níveis de compostos de aroma e

sabor no vinho. É uma linhagem altamente desejável quando o enólogo requer uma contribuição aromática sutil, mas positiva da levedura. Seu valor comercial é de \$ 20,00 (500g) (MAURIVIN, 2015; TCW EQUIPMENT, 2015). Lalvin R2 é uma linhagem de *S. cerevisiae* originalmente isolada em Sauternes, região de Bordeaux (França). Apresenta excelentes propriedades quando cultivada em temperatura frias, sendo utilizada para fermentações em baixas temperaturas, como 5°C. Lalvin R2 ajuda a produzir vinhos brancos intensos devido à liberação de aromas frutados e florais. Seu valor comercial é de \$61,20 (500g) (SCOTT LABORATORIES, 2015; PRESQUE ISLE WINE CELLARS, 2015). Mycoferm Crio SP é uma *S. cerevisiae* selecionada na França, na região de Champagne. É uma linhagem varietal, que respeita as características originais da uva e é particularmente indicada para a produção de vinhos espumantes, de vinhos brancos e na fermentação de mostos em baixa temperatura (a partir de 9°C). Seu valor comercial é de \$51,65 (500g) (ENOLTECH, 2015). Mycoferm Cru 05 é uma *S. cerevisiae* selecionada para a produção de vinhos tintos, que valoriza o "terroir" das variedades, tais como: Nebbiolo, Pinot nero, Teroldego, Cabernet, Merlot, Refosco, Sangiovese e Montepulciano. Essa levedura possui um alto rendimento de álcool, é vigorosa, possui uma fase lag curta mesmo em temperaturas médias à baixas de fermentação. Contribui positivamente para a sensação de suavidade devido a uma maior produção de glicerol, e apresenta o "bouquet" com agradáveis notas de frutos silvestres. Seu valor comercial é de \$51,65 (500g) (ENOLTECH, 2015). Fermol Rouge é uma *S. cerevisiae* selecionada a partir de mosto obtido de uvas tintas. É indicada para fermentações com altas concentrações de açúcar, fermentações de vinhos tintos, possui um espectro de temperatura de fermentação de 10 a 32°C e baixa formação de espuma. Com essa levedura obtêm-se vinhos finos que refletem as características varietais, com aumento das notas de aromas de frutos vermelhos. Seu valor comercial é de \$34,00 (500g) (AEB GROUP, 2015; AEB USA, 2015).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos micro-organismos

As leveduras foram isoladas a partir de mosto fermentado de uva (*Vitis vinifera* L.) das variedades Syrah, Tempranillo, Cabernet Sauvignon e Petit Verdot como tintas, e Chenin blanc como branca. As coletas das uvas foram realizadas de 2011 a 2013 no Vale do São Francisco nas fazendas: Ouro Verde/Miolo (Casa Nova/BA), Botticelli/Milano (Santa Maria/PE), Ducos Vinícola (Lagoa Grande/PE) e Vinibrasil/Rio Sol (Lagoa Grande/PE). A variedade Syrah foi colhida nas fazendas Ouro Verde/Miolo, Ducos Vinícola e Vinibrasil/Rio Sol; a variedade Tempranillo na fazenda Vinibrasil/Rio Sol e Ouro Verde/Miolo; a variedade Petit Verdot na fazenda Ducos Vinícola; a variedade Cabernet Sauvignon nas fazendas Vinibrasil/Rio Sol e Ducos Vinícola; a variedade Chenin blanc nas fazendas Ouro Verde/Miolo e Botticelli/Milano. Nas fazendas, as uvas foram colhidas em dez pontos de amostragem, em cada lote das cinco variedades de uvas, numa distância aproximada entre os pontos de 80 a 100 m; nesse sentido, para a variedade Syrah foi colhida um total de 30 amostras, para a variedade Tempranillo um total de 20 amostras, para a variedade Petit Verdot um total de 10 amostras, para a variedade Cabernet Sauvignon um total de 20 amostras e para a variedade Chenin blanc um total de 20 amostras. Cerca de 1 a 2 kg de uvas foram assepticamente coletados em sacos plásticos esterilizados, transportados sob refrigeração e enviados para processamento em até, no máximo, 48 horas após a coleta no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Sergipe.

No laboratório, as uvas coletadas foram esmagadas nos sacos esterilizados utilizados na coleta para a extração do suco, e um volume de 500 mL desse suco foi transferido para frascos esterilizados para que o processo de fermentação espontânea tivesse início, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A fermentação foi acompanhada e quando o valor dos açúcares totais, medidos em °Brix por um refratômetro portátil, tornou-se estável, procedeu-se como isolamento das leveduras. Contudo, essa estabilização dos valores dos açúcares totais não ocorreu no mesmo tempo para cada variedade de uva.

Para os isolamentos foram preparadas diluições decimais de cada amostra. O inóculo de cada diluição foi realizado em triplicata, utilizando-se 0,1 mL de suspensão das de diluições decimais apropriadas (10^{-2} à 10^{-6} , dependendo do meio utilizado). 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%, agar 2%, 0,01% de cloranfenicol), no

qual foram plaqueadas as diluições 10^{-4} e 10^{-6} . O meio agar YCB-lisina (Yeast Carbon Base 1,17%, agar 2%, lisina 0,056%, 0,01% de cloranfenicol) foi utilizado para o isolamento de leveduras não-*Saccharomyces*, sendo empregadas, para esse meio as diluições de 10^{-2} e 10^{-4} . As placas foram incubadas a 25°C por três a sete dias. Após esse período, foram purificados 5 isolados do morfotipo dominante das placas de maior diluição (contagens de 30 a 300 colônias) e um exemplar de cada morfotipo diferente observado nas placas de agar YM e agar YCB-lisina. Todos os isolados foram preservados por congelamento em ultrafreezer a -80 °C.

2.2 Identificação das leveduras

As características macromorfológicas como tamanho, forma, elevação, borda, cor e textura foram analisadas após o crescimento colonial dos diferentes morfotipos isolados. Logo a seguir, os isolados foram testados em relação à capacidade de assimilar diferentes fontes de carbono e nitrogênio, além de submetidos a testes de osmotolerância, resistência à antifúngicos, termotolerância e fermentação de açúcares (KURTZMAN et al., 2011). Esse procedimento foi realizado para que as leveduras de um mesmo perfil fisiológico fossem agrupadas para os ensaios moleculares posteriores.

2.2.1 Caracterização molecular das linhagens *Saccharomyces cerevisiae*

As linhagens dos isolados de *S. cerevisiae* foram diferenciadas pela análise de restrição do DNA mitocondrial (mtDNA-RFLP) conforme descrito por Querol e colaboradores (1992a; 1992b; 1994).

Obtenção do DNA total

Para a extração de DNA total, as leveduras foram reativadas em meio ágar YM por 24 a 48 h a 25°C. Posteriormente, os isolados foram cultivados em 1,2 mL de caldo GPY (2% de glicose; 1% de peptona bacteriológica; 1% de extrato de levedura) “overnight” (durante a noite toda) a 28°C sob agitação de 100 rpm. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 12.000 rpm por 3 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células, para serem lavadas, foram re-suspendidas em 1 mL de água destilada esterilizada e centrifugadas novamente a 12.000 rpm por 3 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento re-

suspendido em 500 µL de Solução I (0,9M de Sorbitol e 0,1M de EDTA). A essa solução foram adicionados 30 µL da enzima lítica Zimoliasa 20T (1 µg/µL dissolvida em Solução I), seguida de homogeneização no vortex, e incubação a 37°C por 30 minutos para a liberação dos protoplastos.

Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 1 minuto em temperatura ambiente, e, em seguida, o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi re-suspendido suavemente com a ajuda de uma ponteira, em 500 µL de Solução II (Tris-HCl 50 mM e EDTA 20 mM pH 7,4), à qual foram adicionados 13 µL de SDS 10%. Procedeu-se com uma homogeneização por inversão e incubação a 65°C por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se às amostras 200 µL de acetato de potássio 3 M e estas foram incubadas em freezer a -20°C por 1 hora. Após esse procedimento, as células foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C.

Após a etapa anterior, as amostras foram colocados no gelo e o sobrenadante transferido, cuidadosamente, para outro tubo esterilizado, ao qual foram adicionados 700 µL de isopropanol. Em seguida, procedeu-se com uma homogeneização suavemente por inversão e os tubos foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. Após essa incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado cuidadosamente, e ao *pellet* de DNA formado acrescentados 500 µL de etanol 70%. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 12.000 rpm. Após a lavagem com etanol, o sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o DNA foi deixado, por 10 minutos, invertido sobre um papel toalha para a saída de todo o etanol. Após esse procedimento, os tubos foram ainda colocados em estufa a 37°C por 30 minutos para total evaporação do etanol. A re-hidratação foi realizada com 20 µL de água ultrapura esterilizada, e os tubos foram preservados à temperatura de -20°C.

RFLP-mtDNA (Polimorfismo de restrição do DNA mitocondrial)

A digestão foi realizada utilizando-se 20 µL do DNA total acrescido de 10 µL de uma mistura contendo 4,0 µL de água de injeção esterilizada, 3,0 µL de tampão 10x da enzima *Hinf I*, 1,5 µL de RNase 20 mg/mL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 1,5 µL da enzima de restrição *Hinf I* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A incubação foi conduzida à temperatura de 37°C “overnight”. Os produtos da digestão foram corados com solução de GelRed e tampão de corrida 6x, e separados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (80 V por 150 minutos) em tampão TBE 0,5X. Os perfis de restrição do DNA mitocondrial gerados foram

visualizados sob luz ultravioleta e fotografados utilizando-se 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 dos perfis de restrição do DNA mitocondrial dos isolados de *S. cerevisiae* obtidos com os perfis das seis linhagens comerciais de *S. cerevisiae* mais utilizadas na região do Vale do São Francisco. As linhagens comerciais testadas foram: *S. cerevisiae* AWRI 796 da marca Maurivin, nomeada neste trabalho por C1; *S. cerevisiae* (var. *bayanus*) da marca Lalvin R2 (C2); *S. cerevisiae* (var. *bayanus*) da marca Mycoferm Crio SP (C3); *S. cerevisiae* (var. *bayanus*) PDM da marca Maurivin (C4); *S. cerevisiae* da marca Mycoferm (C5); *S. cerevisiae* da marca Fermol Rouge (C6). A fazenda Ouro Verde/Miolo (Casa Nova/BA) utiliza a levedura comercial Maurivin AWRI 796 (C1), Mycoferm Crio SP (C3) e Maurivin PDM (C4); na fazenda Botticelli/Milano (Santa Maria/PE) utiliza a levedura comercial Maurivin PDM (C4); na fazenda Ducos Vinícola (Lagoa Grande/PE) utiliza a levedura comercial Mycoferm Cru 05 (C5); na fazenda Vinibrasil/Rio Sol (Lagoa Grande/PE) utiliza as leveduras comerciais Maurivin AWRI 796 (C1), Maurivin PDM (C4) e Lalvin R2 (C2).

2.2.2 Caracterização molecular das leveduras não-*Saccharomyces*

Extração do DNA nuclear

Os isolados de leveduras não-*Saccharomyces* agrupados pela caracterização morfo-fisiológica foram crescidos em meio ágar YM por 24-48h a 25°C. Após o crescimento, as colônias foram re-suspendidas em 100 µL de tampão de lise (1M Tris-HCl, 0,5 M EDTA, 5M NaCl, 10% SDS e água ultrapura esterilizada) e incubadas a 65°C por no mínimo 30 minutos. Em seguida, foram adicionados aos microtubos 200 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e esses foram homogeneizados gentilmente, por inversão, e centrifugados por 15 minutos a 14.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido com o auxílio de pipeta para um novo microtubo, ao qual foram adicionados v/v de isopropanol na temperatura ambiente, seguida de uma espera durante 15 minutos, na bancada, para o DNA precipitar. Uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos foi então realizada, e, após essa etapa, o sobrenadante foi descartado por inversão. Foram adicionados 200 µL de etanol 70% gelado ao microtubos, seguida de uma homogeneização por inversão e centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado por inversão e após essa etapa, o

DNA foi deixado à temperatura ambiente “overnight” para evaporação de todo o etanol. O DNA foi re-hidratado com a adição de 50 µL de tampão TE (Tris-EDTA, pH 8) e, posteriormente, quantificado em aparelho NanoDrop (NanoDrop Technologies). O DNA extraído foi estocado em freezer a -20°C.

PCR utilizando-se o iniciador EI1(Intron Splice Site)

Após a extração do DNA nuclear foram realizadas reações de PCR utilizando-se o iniciador EI1 – *Intron Splice Site* (5’CTGGCTTGGTGTATGT’3) conforme metodologia descrita por de Barros Lopes e colaboradores (1996). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25µL contendo 2,5 µL de tampão de PCR 10X (⁺KCl), 1,5 µL de MgCl₂ 25mM, 1 µL de dNTP 0,05mM, 2 µL da solução do iniciador EI1 a 10 pmol⁻¹, 0,2 µL de Taq DNA polimerase 1,25 U, 1 µL do DNA e água ultrapura esterilizada suficiente para completar o volume final. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o termociclador Mastercycler (Eppendorf). O programa de ciclagem consistiu inicialmente da desnaturação do DNA a 94 °C por 3 minutos seguida de 33 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 45 °C por 2 minutos e polimerização a 74 °C por 1,30 minutos, e com uma extensão final a 74 °C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% (80 V por 90 minutos) em tampão TBE 0,5X. Os perfis de banda foram visualizados com auxílio de luz ultravioleta e fotografados utilizando-se um sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat). A partir da análise dos perfis de bandamento, as leveduras foram agrupadas de acordo com os perfis moleculares obtidos.

Sequenciamento da região ITS e dos domínios D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA

Um isolado de cada perfil molecular distinto obtido com o iniciador EI1 foi submetido ao sequenciamento da região ITS-5.8S e dos domínios D1/D2 da subunidade maior do rDNA. Para a reação de PCR, foram utilizados os iniciadores ITS-1 (5’-TCCGTAGGTGAACCTTGCGG-3’) e NL-4 (5’-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3’), segundo Lachance e colaboradores (2003). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de tampão de PCR “high fidelity” 10X (⁺KCl), 2 µL de MgCl₂ 25mM, 2 µL de dNTP 0,05mM, 1 µL dos iniciadores ITS-1 e NL4 a 10 pmol⁻¹ (MWG Biotech), 0,2 µL de Taq DNA polimerase 1,25 U (Platinum® Taq DNA Polymerase High

Fidelity), 1 µL do DNA e água de injeção esterilizada suficiente para completar o volume final. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o termociclador Mastercycler (Eppendorf). O programa de ciclagem consistiu de uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 95°C, 25 segundos de anelamento do iniciador a 54°C e 20 segundos de extensão a 72°C, e uma extensão final por 10 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (120 V por 30 minutos) em tampão TBE 0,5X. Os perfis de banda foram visualizados com auxílio de luz ultravioleta e fotografados utilizando-se um sistema de fotodocumentação (Vilber Lourmat).

Para a reação de sequenciamento, os produtos de PCR (amplicons) foram purificados da seguinte forma: foram adicionados aos amplicons um volume de 11,75 µL de EDTA 125mM e 141 µL de etanol absoluto. Os tubos foram homogeneizados por inversão e deixados na bancada por 15 minutos para a precipitação do DNA. Após esse tempo, o tubo foi centrifugado a 14.000 rpm por 25 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado, sendo adicionados ao *pellet* formado 120 µL de etanol 70% para lavagem do sedimento, seguida de homogeneização por inversão, e centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. Logo após, o sobrenadante foi descartado e o DNA foi deixado em temperatura ambiente “*overnight*” para evaporação do etanol. O DNA foi ressuscitado com a adição de 10 µL de água de ultrapura esterilizada e hidratado por 30 minutos a 37°C. O produto obtido foi dosado em aparelho NanoDrop ND 1000.

As reações de sequenciamento dos produtos obtidos após a purificação dos amplicons foram realizadas utilizando-se o kit Big Dye versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730. A reação de sequenciamento foi realizada em microplacas de 96 poços (Applied Biosystems, EUA) preparadas para um volume final de 10 µL, nas quais foram colocados: 1 µL do iniciador (NL1/NL4 ou ITS1/ITS4) a 5 µmol⁻¹, 1 µL de tampão (presente no kit de sequenciamento), 1 µL de Big Dye, 1 a 5 µL de DNA (de modo que a reação final apresentasse entre 15 e 20 ng de DNA) e água ultrapura esterilizada para completar o volume, se necessário. O programa de ciclagem utilizado consistiu de uma desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto e 36 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos, e 4 minutos de extensão a 60°C. Após a amplificação, os produtos foram submetidos ao processo de precipitação com o acréscimo de 1 µL de EDTA a 125 mM, 1 µL de acetato de amônio e 50

μL de etanol 96% (Merck) em cada poço. A placa foi vortexada brevemente e então incubada por 15 minutos em temperatura ambiente, protegida da luz (escuro). Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 3.700 rpm em temperatura ambiente e o sobrenadante descartado por inversão. Em seguida, foram acrescentados 100 μL de etanol 70% (Merck) e as amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 3.700 rpm em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado por inversão e em cada poço foram acrescentados 10 μL de Formamida HI DI (Applied Biosystems, EUA). A placa foi armazenada a 4°C, protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado ABI 3730.

As sequências de DNA foram analisadas utilizando-se 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 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>), e as sequências similares foram alinhadas utilizando-se o programa CLUSTALW software package (EMBL-EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Para ser considerado pertencente a uma espécie conhecida, o isolado deve apresentar identidade na sequência analisada igual ou acima de 99% em relação à outra já depositada no GenBank. O número de substituições de bases foi observado também, sendo 0 a 3 bases diferentes não contíguas, pode ser considerada a mesma espécie, e maior ou igual a 6 substituições, pode ser considerada uma espécie nova, para as sequências da região D1/D2; para a região ITS, até 8 diferenças na mesma sequência pode ser considerada a mesma espécie (KURTZMAN; ROBNETT, 1998; FELL, 2000).

2.3 Seleção das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* não produtoras do gás sulfeto de hidrogênio (H₂S)

Para averiguar se as linhagens de *S. cerevisiae* produziam ou não o gás sulfeto de hidrogênio (H₂S) foi realizado um teste qualitativo utilizando o meio diferencial Bacto Bismuth Sulfite Ágar (BSA), de acordo com metodologia descrita por Zambonelli (1964 a, b), e Jiranek e colaboradores (1995b). Para visualizar a produção ou não desse gás, as colônias foram inoculadas no meio BSA e incubadas por 3 dias a 30°C. As colônias produtoras de H₂S apresentam uma coloração escura (marrom ou negra), devido à reação desse composto com o sulfeto ferroso presente no meio, formando assim o sal sulfeto de ferro, de coloração negra a

marrom escuro. As leveduras não produtoras do H₂S apresentam-se como colônias brancas a creme claro. Esse teste também foi realizado com as linhagens comerciais de *S. cerevisiae*.

2.4 Microfermentações com as diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

2.4.1 Micro-organismos utilizados

As microfermentações em mosto sintético (simulando o mosto natural da uva) foram realizadas em duplicatas, em escala laboratorial, utilizando-se de um a nove representantes de cada linhagem diferente de *S. cerevisiae* encontradas a partir da técnica de polimorfismo de restrição do DNA mitocondrial (RFLP-mtDNA). Quanto maior o número de isolados pertencentes a um determinado perfil de restrição, maior foi o número de representantes desse perfil utilizado para realizar as microfermentações. O desempenho fermentativo das leveduras selecionadas foi comparado com os resultados obtidos para as seis linhagens comerciais de *S. cerevisiae*.

2.4.2 Mosto sintético de fermentação

As fermentações foram realizadas em mosto sintético (pH 3,3), conforme previamente descrito por Bely e colaboradores (1990) e Rossignol e colaboradores (2003), e sem fatores anaeróbicos adicionados ao mosto. O mosto conteve:

- 200 g/L de **açúcar** (100 g/L de glicose e 100 g/L de frutose);
- 6 g/L de **ácido cítrico**;
- 6 g/L de **DL-ácido málico**;
- **Sais minerais** (750 mg/L de KH₂PO₄, 500 mg/L de K₂SO₄, 250 mg/L de MgSO₄.7H₂O, 155 mg/L de CaCl₂.2H₂O, 200 mg/L de NaCl, 4 mg/L de MnSO₄.H₂O, 4 mg/L de ZnSO₄, 1 mg/L de CuSO₄.5H₂O, 1 mg/L de KI, 0,4 mg/L de CoCl₂.6H₂O, 1 mg/L de H₃BO₃, 1 mg/L de (NH₄)₆Mo₇O₂₄);
- **Vitaminas** (20 mg/L meso-inositol, 1,5 mg/L pantotenato de cálcio, 0,25 mg/L tiamina, 2 mg/L ácido nicotínico, 0,25 mg/L piroxidina, 0,003 mg/L biotina);
- 300 mg/L de **nitrogênio assimilado** (nitrogênio amoniacal e nitrogênio α -amino) promovido pela mistura de **18 aminoácidos** (18,3 mg/L de L-tirosina, 179,3 mg/L de L-triptofano, 32,7 mg/L de L-isoleucina, 44,5 mg/L L-ácido aspártico, 120,4 mg/L L-ácido glutâmico, 374,4 mg/L L-arginina, 48,4 mg/L L-leucina, 759,2 mg/L L-treonina, 18,3 mg/L L-glicina, 505,3 mg/L L-glutamina, 145,3 mg/L L-alanina, 44,5 mg/L L-valina,

31,4 mg/L L-metionina, 37,9 mg/L L-fenilalanina, 78,5 mg/L L-serina, 32,7 mg/L L-histidina, 17,0 mg/L L-lisina, 13,1 mg/L L-cisteína) correspondendo a 180 mg de nitrogênio e 460 mg/L de NH_4Cl , correspondendo a 120 mg de nitrogênio (totalizando assim 300 mg/L de nitrogênio assimilado).

2.4.3 Condições de fermentação

Os isolados de *S. cerevisiae* foram crescidos em 5 mL de meio YPD (1% extrato de levedura, 1% peptona bacteriológica, 2% glicose) “overnight” em agitação de 100 rpm a 28°C. Após o crescimento, foi medida a densidade óptica (DO, 600nm) da cultura para ser utilizada como inóculo e calculado o volume necessário para cada isolado ser inoculado à uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ inicial de 0,5 (10^6 células/mL) no mosto sintético de fermentação. Antes da inoculação, as células das leveduras foram lavadas com água destilada esterilizada, centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e as células re-suspendidas em 0,8 mL do mosto sintético para serem completadas com o volume de 1mL do mesmo mosto e assim se atingir o volume final de meio utilizado nesse ensaio (1,8mL).

As fermentações foram realizadas numa microplaca esterilizada com volume útil de 2mL e contendo em cada poço 1,8mL do mosto sintético. A microplaca foi incubada sob agitação de 100 rpm a 28°C. A partir de Após 48h de fermentação, para cada amostra foi retirado por dia 100µL do mosto em fermentação e dosada a DO utilizando-se o aparelho Tecan (Infinite M200). Os valores de Açúcares Redutores Totais (ART) foram determinados pelo método do ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS) conforme preconizado por Miller (1959), no comprimento de onda de 540 nm analisados no Tecan. Quando o valor de ART atingiu uma concentração < 2 g/L, o volume restante do mosto de fermentação foi retirado e centrifugado (14.000 rpm por 15 minutos), e o sobrenadante foi armazenado a -20°C para posterior análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) para determinar as concentrações de etanol, glicerol, ácido acético, glicose e frutose.

2.4.4 Determinação do etanol, compostos secundários e açúcares por HPLC

As dosagens dos açúcares (glicose e frutose), ácido acético, etanol e glicerol de cada amostra do ensaio de microfermentação foram determinadas por HPLC (modelo Prominence Model LC-20A – Shimadzu), utilizando-se a coluna SUPELCOGEL C-610H 30 cm x 7,8 mm (Sigma–Aldrich) mantida à temperatura de 45°C e detector de índice de refração RID-10A.

As amostras foram filtradas utilizando-se membrana de acetato de celulose 0,22 µm (Sartorius Stedim Biotech), diluídas e analisadas sob as seguintes condições: volume de injeção de 20µL, fase móvel H₂SO₄ 5mM e fluxo de 0,6 mL/min.

2.5 Produção dos vinhos em pequena escala

Os vinhos foram elaborados em pequena escala no Laboratório de Enologia e no Laboratório de Controle Biológico da EMBRAPA Semiárido (Petrolina, PE). A variedade de uva (*Vitis vinifera* L.) escolhida foi a Syrah, visto que dentre as variedades cultivadas no Submédio do Vale do Rio São Francisco essa foi uma das que mais se adaptou às condições dessa região (PEREIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015), e o tipo de vinho produzido foi o tinto. Para a produção dos vinhos, foram escolhidas nove linhagens indígenas diferentes de *S. cerevisiae*, representando aquelas com os melhores resultados encontrados de acordo com os parâmetros fermentativos estudados para a análise das microfermentações. Também foram escolhidas duas linhagens comerciais utilizadas na região do Vale do São Francisco para a produção de vinhos tintos (*S. cerevisiae* AWRI 796 da marca Maurivin, nomeada neste trabalho de C1 e *S. cerevisiae* da marca Fermol Rouge chamada de C6). A levedura comercial C1 é a mais utilizada na produção dos vinhos da região; a levedura C6 também é frequentemente utilizada nessa região para a produção de vinhos tintos.

2.5.1 Procedimentos laboratoriais para a produção dos vinhos

As linhagens escolhidas para a produção dos vinhos foram reativadas em meio ágar YM por 24h a 28°C. Em seguida, as leveduras crescidas foram transferidas, separadamente, para 10 mL de caldo YPD e colocadas “overnight” sob agitação de 100 rpm a 28°C. Após o crescimento, a concentração de células foi quantificada em Câmara de Neubaur. Esse procedimento permitiu calcular a concentração inicial de células de cada isolado para ser inoculada no mosto da uva (Syrah), para que a fermentação apresentasse inicialmente uma concentração de 2×10^6 UFC/mL. As uvas foram esmagadas com as mãos (usando luvas) e juntamente com o mosto (produzido pelo esmagamento) foram colocadas nas garrafas. O volume final de mosto utilizado por garrafa foi de 600 mL, e a fermentação foi conduzida em garrafas de 750 mL vedadas com válvulas Müller, mantidas à uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ para a elaboração do vinho tinto. O mosto da uva foi tratado inicialmente com o antioxidante Metabissulfito (10 g/100L).

Após inoculação da levedura, as garrafas foram pesadas (tempo zero), e esse processo foi repetido a cada 24 horas. Quando o valor da pesagem permaneceu constante durante 2 dias seguidos (variação $\leq 0,20$ g/dia) deu-se por encerrada a fermentação e retiradas as alíquotas. As alíquotas foram filtradas com membrana de acetato de celulose 0,2 μ m e estocadas a -20°C para as dosagens de glicose, frutose, etanol, glicerol e ácido acético por HPLC. Esses compostos também foram dosados no mosto inicial, sem a inoculação da levedura, para a determinação de suas concentrações iniciais. Cada ensaio de fermentação foi realizado em triplicata.

Para os cálculos de etanol (%v/v), rendimento de etanol, em 200 g/L de açúcares, e rendimento de etanol %, segue abaixo as fórmulas:

- **etanol (%v/v)** = [(concentração de etanol, em g/L) x 0,1] / [0,789, em g/L, densidade do etanol]

- **rendimento de etanol, em 200 g/L de açúcares** = (concentração de etanol, em g/L) / (concentração de glicose + concentração de frutose, em g/L)

- **rendimento de etanol (%), em 100 g/L de açúcares** = (rendimento de etanol, em 200 g/L) x 100 / 200

2.5.2 Análise da presença dos compostos fenólicos totais dos vinhos

Os compostos fenólicos totais presentes nos vinhos foram quantificados pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando-se o ácido gálico como padrão de referência. Esse método baseia-se na redução do complexo fosfotungstico-fosfomolibdico (presente no reagente Folin-Ciocalteu) a um complexo azul Mo-W pelos compostos fenólicos, que ao reagirem oxidam os fenolatos (WILDENRADT; SINGLETON, 1974; SLINKARD; SINGLETON, 1977; VINSON et al., 1998; SINGLETON et al., 1999). A metodologia foi utilizada de acordo com Singleton e Rossi (1965), com algumas modificações. As amostras dos vinhos foram diluídas na proporção de 1:15. Uma alíquota de 0,5 mL da diluição foi transferida para um tubo de vidro de 20 mL, ao qual adicionou-se logo a seguir 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (Reagentes Analíticos Impex) seguida de homogeneização utilizando-se vortex. Essa mistura foi deixada sem agitação por 3 minutos para a reação, e, após esse tempo, foram adicionados 0,5 mL de Na₂CO₃ (20%) e 3,5 mL de água destilada. A mistura foi homogeneizada com auxílio de vórtex e mantida sem agitação e protegida da luz (escuro) por 90 minutos. Decorrido esse tempo, a leitura foi realizada a 725 nm em espectrofotômetro. Foi construída uma curva analítica contendo 0,05, 0,1, 0,15, 0,2,

0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5 mg/mL de ácido gálico e os resultados expressos em mg de ácido gálico equivalente por mL (mg GAE/mL). Todas as amostras foram determinadas em triplicatas. Esse experimento foi realizado na Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza (CE), no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais.

2.5.3 Determinação do etanol, compostos secundários e açúcares por HPLC

As dosagens dos açúcares (glicose e frutose), ácido acético, etanol e glicerol de cada vinho foram determinadas por HPLC, modelo Prominence Model LC-20A (Shimadzu), coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) mantida a 65°C e detector índice de refração RID-10A. Todas as amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose 0,2 µm (Sartorius Stedim Biotech) e diluídas apropriadamente (1:5). Foi utilizado um volume de injeção de 20µL e como fase móvel H₂SO₄ 5mM, num fluxo de 0,6 mL/min . Essa etapa foi realizada na Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza (CE), no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais.

2.5.4 Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS)

A composição volátil dos vinhos foi determinada por Microextração por Fase Sólida (SPME-Solid Phase Micro Extration) associada à Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas (GC-MS) no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais, pertencente à Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza, CE). A metodologia de extração, identificação e quantificação dos compostos voláteis foi realizada conforme o método descrito por Canuto e colaboradores (2011).

Preparo das amostras

Foram utilizados 8 mL de vinho em um vial de 20 mL, ao qual foram adicionados 10 µL da solução do padrão interno 3-octanol (0,8 g/L em etanol) e 3 g de cloreto de sódio.

Microextração por Fase Sólida (SPME) e GC-MS

Os compostos voláteis dos vinhos foram extraídos por meio da técnica SPME em *headspace* (espaço formado entre a amostra acondicionada e um sistema fechado), empregando-se fibras recobertas com Polidimetilsiloxano (PDMS 100µm). O equilíbrio dos compostos voláteis foi atingido mantendo-se a amostra sob aquecimento a 40°C, com agitação, durante 15 minutos, enquanto que a extração ocorreu por um período de 30 minutos, sem agitação, mas sob a mesma temperatura. Em seguida, os voláteis foram dessorvidos

termicamente por 3 min no injetor do cromatógrafo a gás Agilent Technologies 7890B GC System acoplado ao espectrômetro de massas Quadrupolo Agilent Technologies 5977A MSD. As condições de separação foram as seguintes: coluna capilar HP5-MS 30m (30m x 0,25mm), 0,25µm de filme, utilizando-se hélio como gás de arraste a um fluxo de 1,99 mL/min, sem divisão de fluxo. A temperatura do injetor foi de 240°C e a do detector de 150°C. A rampa de temperatura da coluna foi de 40°C, mantida por 4 minutos, até 80°C, numa razão de 2,5°C/min, posteriormente elevada até 110°C numa razão de 5°C/min, e até 220°C numa razão de 10°C/min, após a qual foi mantida por 5 minutos, perfazendo o total de 42 minutos de corrida cromatográfica.

Identificação dos compostos

A identificação foi feita por meio da comparação dos espectros de massas com a base de dados fornecida pelo equipamento (NIST v. 2.0 – 436.314 compostos), por comparação dos seus índices de retenção de Kovats (obtidos experimentalmente por injeção de uma mistura de padrões contendo uma série homóloga de alcanos: C7-C30), quando determinados, com os dados de índice de retenção de Kovats obtidos na literatura para os mesmos compostos analisados empregando a mesma coluna.

Quantificação dos compostos majoritários:

A concentração dos compostos encontrados foi determinada pela fórmula abaixo:

Concentração do analito = [(área do analito) / (área do 3-octanol)] x concentração do 3-octanol x fator de emendação do analito

2.6 Análise estatística

Todos os resultados das microfermentações, dos vinhos e cromatografias líquida e gasosa foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas com o teste Scott e Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Assistat (versão 7.7.7 beta).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento e identificação das leveduras

Um total de 368 isolados de leveduras foi obtido. Desse total, 259 isolados foram identificados como *S. cerevisiae* e 109 como leveduras não-*Saccharomyces*. Nas três fazendas (Ouro Verde/Miolo, Vinibrasil e Ducos Vinícola) onde houve a colheita da Syrah o total de isolados de leveduras foi de 97; nas duas fazendas (Vinibrasil e Ouro Verde/Miolo) onde houve a colheita da Tempranillo foi de 54; nas duas fazendas (Ouro Verde/Miolo e Botivelli) onde houve a colheita da Chenin blanc foi de 108; nas duas fazendas (Vinibrasil e Ducos Vinícola) onde houve a colheita da Cabernet Sauvignon foi de 64; na fazenda (Ducos Vinícola) onde houve a colheita da Petit Verdot foi de 45. A partir das análises por meio da técnica de RFLP-mtDNA com os isolados de *S. cerevisiae*, 184 foram identificados como isolados indígenas dessa espécie e 75 como isolados comerciais (Figura 3).

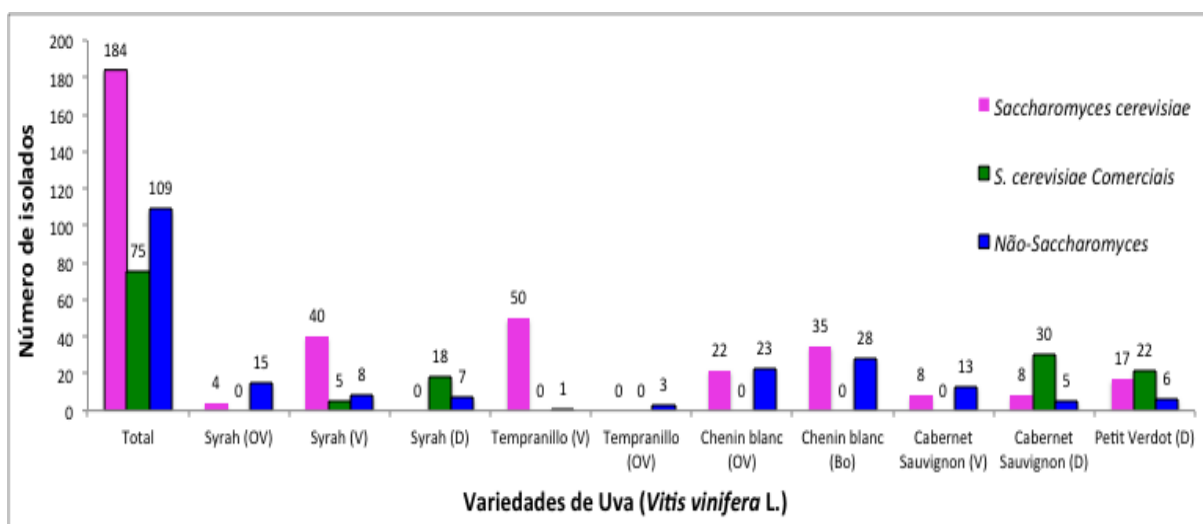


Figura 3. Número de isolados de *Saccharomyces cerevisiae* indígenas, *S. cerevisiae* comerciais e leveduras não-*Saccharomyces* encontrados nos mostos fermentados de uva de cada variedade estudada. OV: Fazenda Ouro Verde; V: Fazenda Vinibrasil; D: Fazenda Ducos Vinícola; Bo: Fazenda Boticelli.

3.1.1 Caracterização molecular das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Os resultados dos ensaios de polimorfismo de restrição do DNA mitocondrial dos isolados de *S. cerevisiae* são mostrados nas figuras 4 a 9. Para os 184 isolados indígenas de *S. cerevisiae* (71% do total de isolados dessa espécie) foram encontrados 22 perfis de restrição do DNA mitocondrial diferentes (Figura 4). Os 75 isolados comerciais (29% do total de isolados de *S. cerevisiae*) foram identificados como pertencentes a dois perfis comerciais

distintos. Essa técnica foi aplicada também com as seis leveduras comerciais de *S. cerevisiae*, sendo que dessas seis leveduras, duas (leveduras C3 e C4) apresentaram o mesmo perfil de restrição do DNA mitocondrial (Figura 5-B). Resultados semelhantes também já foram observados por Fernández-Espinar e colaboradores (2001) e de Ponzzes-Gomes e colaboradores (2014). Esses autores constataram que leveduras comercializadas como sendo linhagens diferentes apresentaram o mesmo perfil de bandas quando comparadas por essa técnica molecular. No presente trabalho, os perfis de restrição do DNA mitocondrial denominados P1 a P22 correspondem aos isolados indígenas de *S. cerevisiae* (Figuras 6 – 9); os perfis P23 a P27 correspondem aos perfis das *S. cerevisiae* comerciais C1 a C6, respectivamente (Figura 5), sendo o perfil P25 correspondente às *S. cerevisiae* comerciais C3 e C4 as quais apresentam o mesmo perfil de restrição do DNA mitocondrial, assim totalizando cinco perfis diferentes de *S. cerevisiae* comerciais. Todos os 22 perfis de restrição do DNA mitocondrial das *S. cerevisiae* indígenas estão distribuídos nas figuras 6 a 9, além daqueles das linhagens de *S. cerevisiae* comerciais que são comparadas nos géis com os perfis das linhagens indígenas. Na tabela 2, a porcentagem dos perfis encontrados está sendo demonstrada por fazenda onde se isolaram as leveduras, sendo na Fazenda Vinibrasil a maior porcentagem (39,8%) encontrada dentre as fazendas, e a segunda foi na Fazenda Ducos (36,7%), entretanto 27% dessa porcentagem corresponde às linhagens comerciais isoladas.

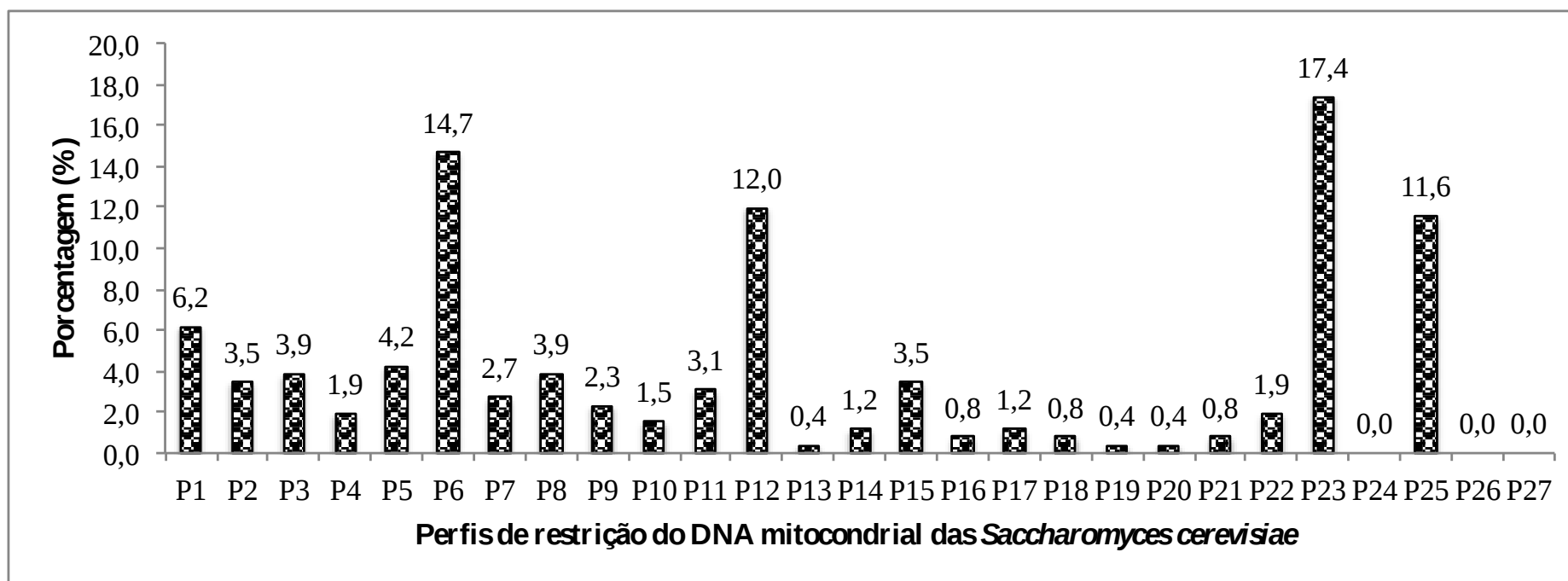


Figura 4. Número de diferentes perfis de restrição do DNA mitocondrial encontrados e porcentagem de ocorrência dos mesmos dentre os isolados de *Saccharomyces cerevisiae* obtidas de uvas do Vale do São Francisco. Os perfis P1 a P22 correspondem aos isolados indígenas de *S. cerevisiae*; os perfis P23 a P27 correspondem aos isolados comerciais de *S. cerevisiae* (leveduras C1 a C6, respectivamente, com as leveduras C3 e C4 apresentando o mesmo perfil P25).

Tabela 2 – Porcentagem dos perfis de restrição do DNA mitocondrial (RFLP-mtDNA) das *Saccharomyces cerevisiae* indígenas e comerciais isoladas em cada fazenda do Vale do São Francisco (Fazenda Vinibrasil; Fazenda Ouro Verde; Fazenda Ducos; Fazenda Botticelli).

Perfis RFLP-mtDNA	Vinibrasil	Ouro Verde	Ducos	Botticelli	Total de perfil (%)
P1	6,2	*ND	*ND	*ND	6,2
P2	3,5	*ND	*ND	*ND	3,5
P3	2,3	1,5	*ND	*ND	3,9
P4	1,9	*ND	*ND	*ND	1,9
P5	4,2	*ND	*ND	*ND	4,2
P6	14,7	*ND	*ND	*ND	14,7
P7	2,3	*ND	0,4	*ND	2,7
P8	0,4	3,5	*ND	*ND	3,9
P9	*ND	1,9	0,4	*ND	2,3
P10	0,4	1,2	*ND	*ND	1,5
P11	*ND	1,9	1,2	*ND	3,1
P12	*ND	*ND	*ND	12,0	12,0
P13	*ND	*ND	*ND	0,4	0,4
P14	*ND	*ND	*ND	1,2	1,2
P15	*ND	*ND	3,5	*ND	3,5
P16	*ND	*ND	0,8	*ND	0,8
P17	*ND	*ND	1,2	*ND	1,2
P18	*ND	*ND	0,8	*ND	0,8
P19	*ND	*ND	0,4	*ND	0,4
P20	*ND	*ND	0,4	*ND	0,4
P21	*ND	*ND	0,8	*ND	0,8
P22	1,9	*ND	*ND	*ND	1,9
P23	1,9	*ND	15,4	*ND	17,4
P24	*ND	*ND	*ND	*ND	0,0
P25	*ND	*ND	11,6	*ND	11,6
P26	*ND	*ND	*ND	*ND	0,0
P27	*ND	*ND	*ND	*ND	0,0
Total por fazenda (%)	39,8	10,0	36,7	13,5	100

*ND = perfil não detectado

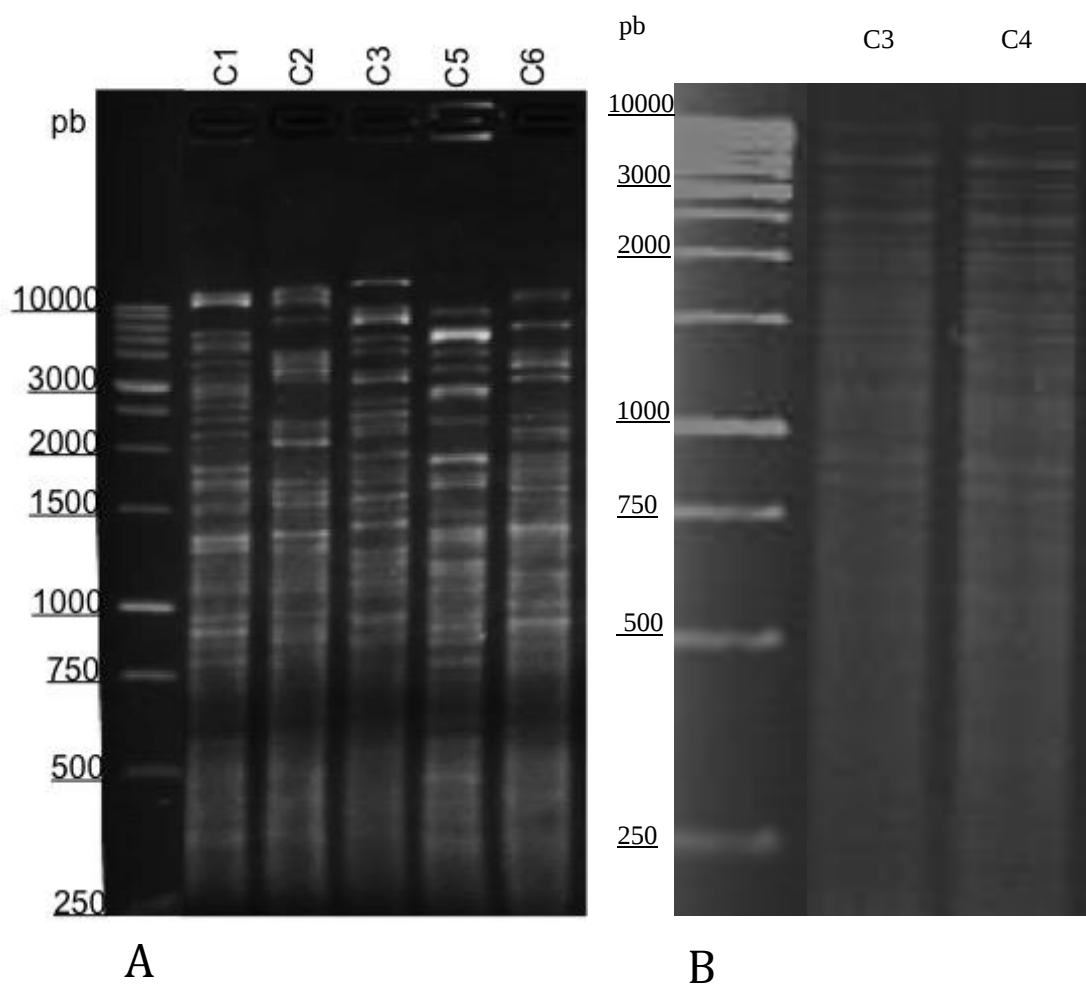


Figura 5. Perfis de restrição do DNA mitocondrial das linhagens comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas para a produção de vinhos do Vale do São Francisco. Marcador Molecular 1kb DNA ladder. Os códigos C1 (Maurivin AWRI 796), C2 (Lalvin R2), C3 (Mycoferm Crio SP), C4 (Maurivin PDM), C5 (Mycoferm Cru 05), C6 (Fermol Rouge) correspondem aos perfis das *S. cerevisiae* comerciais P23, P24, P25, P25, P26 e P27, respectivamente. Na figura 4.B estão representadas as duas *S. cerevisiae* comerciais diferentes C3 e C4 que apresentaram o mesmo perfil de banda.

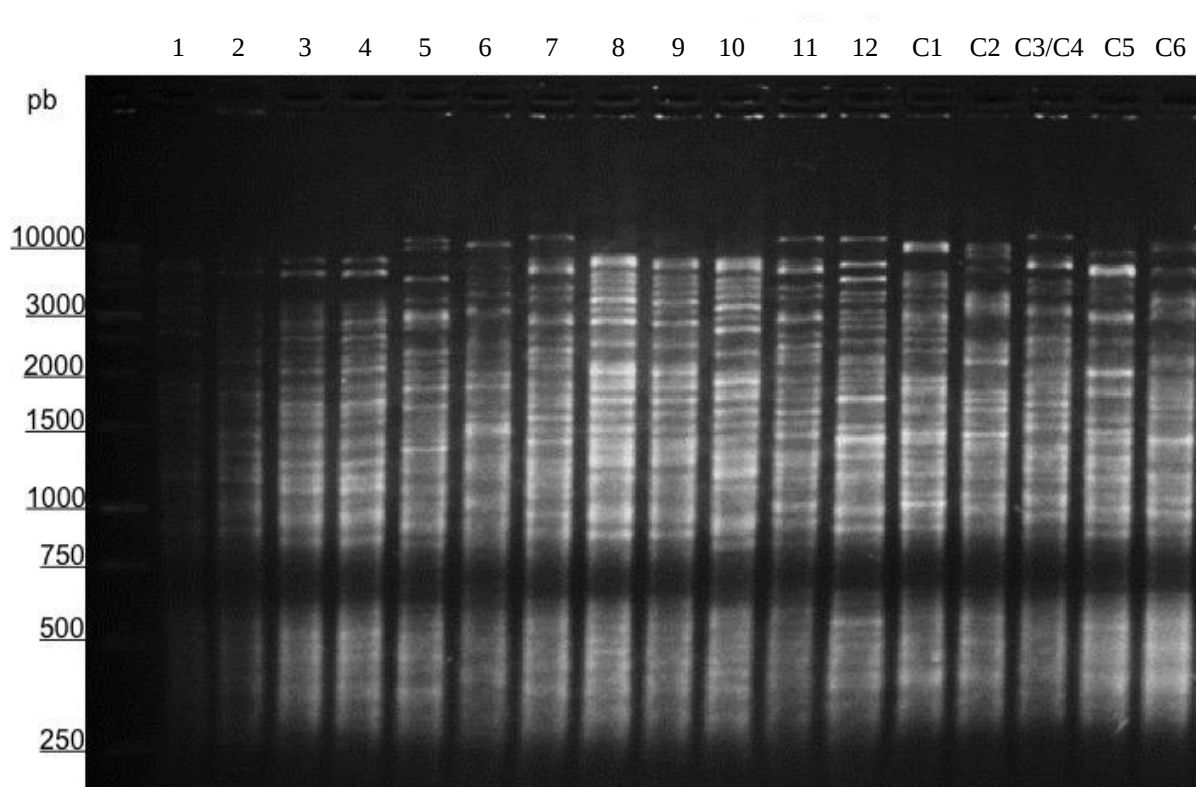


Figura 6. Perfis de restrição do DNA mitocondrial das linhagens indígenas e comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas do mosto fermentado de uvas (*Vitis vinifera* L.) do Vale do São Francisco. Marcador Molecular 1kb DNA ladder. Os códigos C1 (Maurivin AWRI 796), C2 (Lalvin R2), C3 (Mycoferm Crio SP), C4 (Maurivin PDM), C5 (Mycoferm Cru 05), C6 (Fermol Rouge) correspondem aos perfis das *S. cerevisiae* comerciais P23, P24, P25, P26, P27, respectivamente; os códigos de 1 a 12 correspondem às *S. cerevisiae* indígenas de perfis P1, P2, P2, P2, P3, P4, P5, P6, P6, P6, P5, P7, respectivamente.

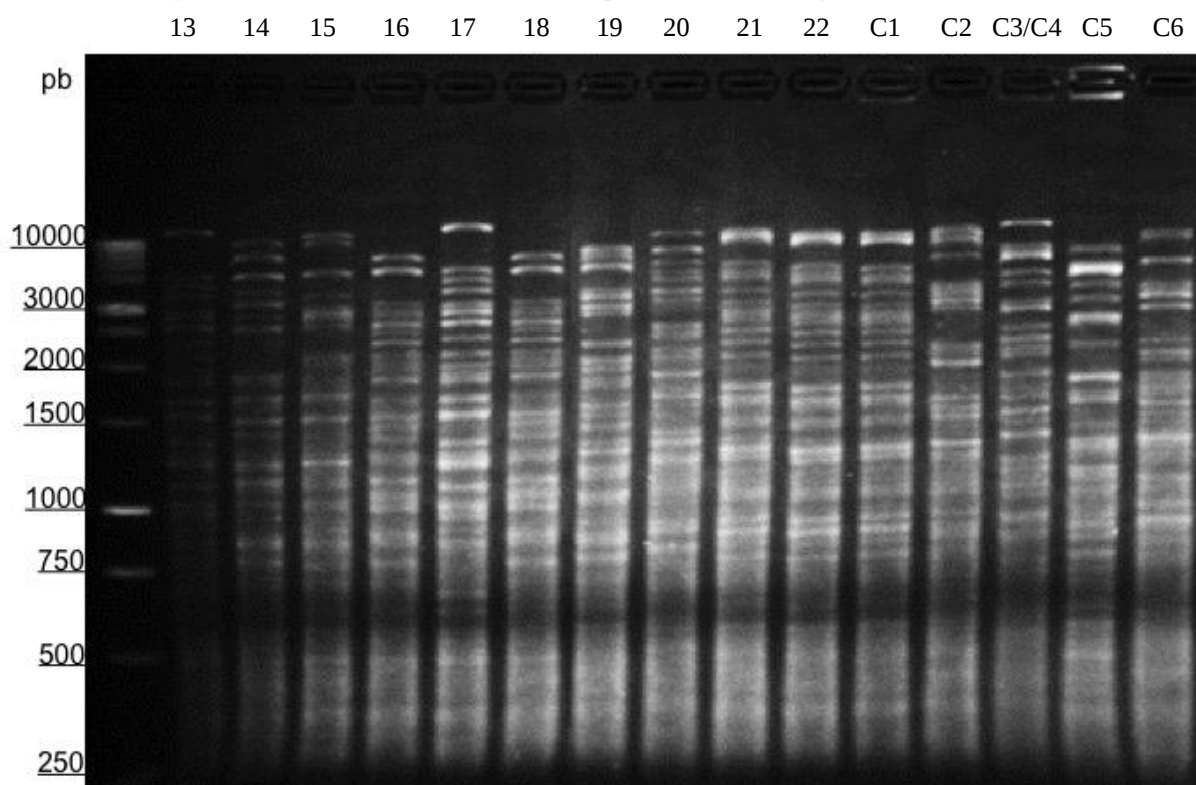


Figura 7. Perfis de restrição do DNA mitocondrial das linhagens indígenas e comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas do mosto fermentado de uvas (*Vitis vinifera* L.) do Vale do São Francisco. Marcador Molecular 1kb DNA ladder. Os códigos C1 (Maurivin, AWRI 796), C2 (Lalvin R2), C3 (Mycoferm Crio SP), C4 (Maurivin PDM), C5 (Mycoferm Cru 05), C6 (Fermol Rouge) correspondem aos perfis das *S. cerevisiae* comerciais P23, P24, P25, P26, P27, respectivamente; os códigos de 13 a 22 correspondem às *S. cerevisiae* de perfis P8, P9, P10, P11, P8, P11, P12, P13, P23, P23, respectivamente. As leveduras de códigos 21 e 22 correspondem ao mesmo perfil da levedura comercial C1 (P23).

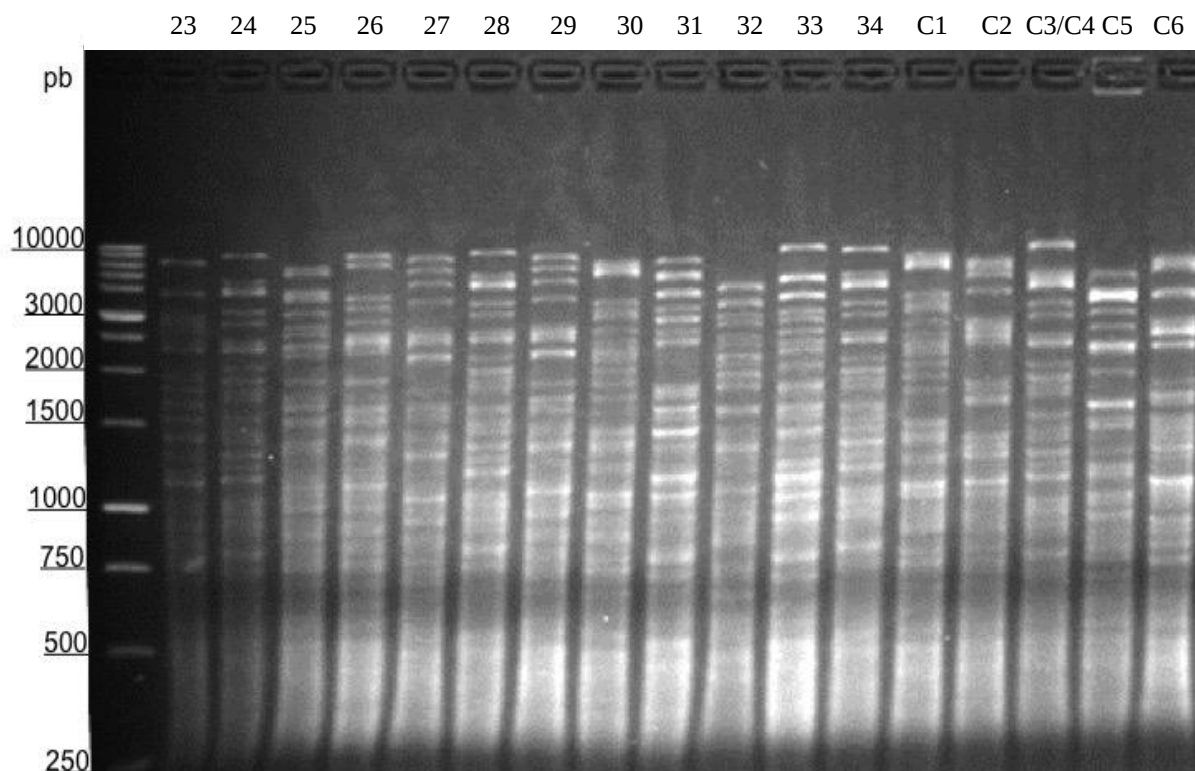


Figura 8. Perfis de restrição do DNA mitocondrial das linhagens indígenas e comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas do mosto fermentado de uvas (*Vitis vinifera* L.) do Vale do São Francisco. Marcador Molecular 1kb DNA ladder. Os códigos C1 (Maurivin, AWRI 796), C2 (Lalvin R2), C3 (Mycoferm Crio SP), C4 (Maurivin PDM), C5 (Mycoferm Cru 05), C6 (Fermol Rouge) correspondem aos perfis das *S. cerevisiae* comerciais P23, P24, P25, P26, P27, respectivamente; os códigos de 23 a 34 correspondem às *S. cerevisiae* de perfis P14, P15, P16, P17, P18, P15, P18, P23, P9, P19, P20, P6, respectivamente. A levedura de código 30 corresponde ao mesmo perfil da levedura comercial C1 (P23).

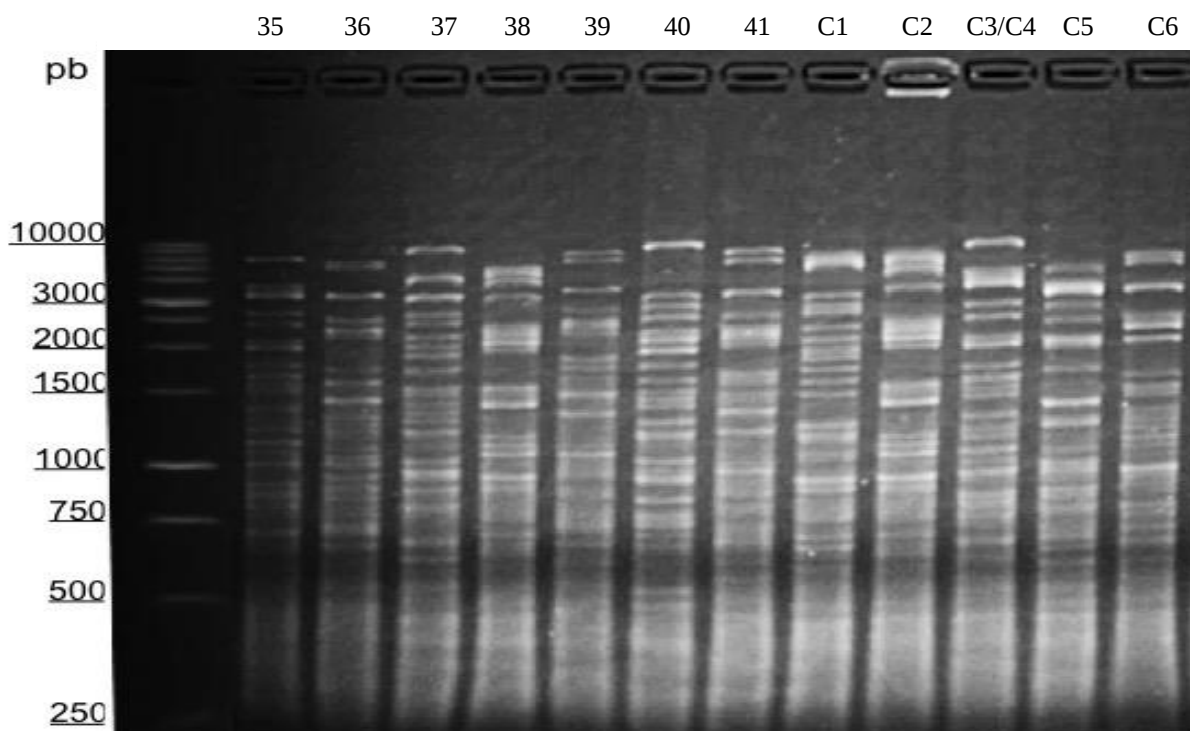


Figura 9. Perfis de restrição do DNA mitocondrial das linhagens indígenas e comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas do mosto fermentado de uvas (*Vitis vinifera* L.) do Vale do São Francisco. Marcador Molecular 1kb DNA ladder. Os códigos C1 (Maurivin, AWRI 796), C2 (Lalvin R2), C3 (Mycoferm Crio SP), C4 (Maurivin PDM), C5 (Mycoferm Cru 05), C6 (Fermol Rouge) correspondem aos perfis das *S. cerevisiae* comerciais P23, P24, P25, P26, P27, respectivamente; os códigos de 35 a 41 correspondem às *S. cerevisiae* de perfis P25, P21, P7, P22, P3, P8, P10, respectivamente. A levedura de código 35 corresponde ao mesmo perfil da levedura comercial C3/C4 (P25).

De acordo com a figura 4 e tabela 2, o perfil de restrição do DNA mitocondrial encontrado em maior número foi referente à linhagem comercial C1 (perfil P23), que representou 17,4% do total de isolados de *S. cerevisiae*, seguido pela linhagem indígena de perfil P6 (14,7% dos isolados), e da linhagem indígena de perfil P12 (12%) e comercial C3/C4 de perfil P25 (11,6%). Nas figuras 6 a 9, pode-se observar a diversidade de perfis de restrição do DNA mitocondrial das *S. cerevisiae* indígenas e comerciais. A ocorrência de perfis de restrição correspondente a linhagens comerciais utilizadas na região pode ser justificada pelo descarte nos vinhedos de resíduos da elaboração dos vinhos produzidos, possibilitando a colonização das uvas por essas leveduras. A maior ocorrência da linhagem comercial C1 sugere que esta apresenta uma boa adaptação às condições presentes no vinhedo, tornando-se prevalente em relação às indígenas.

Capece e colaboradores (2013a) estudaram a diversidade de *S. cerevisiae* isoladas depois da maturação dos tradicionais vinhos da Geórgia (União Europeia). Em 70 isolados indígenas de *S. cerevisiae*, os autores encontraram 23 diferentes perfis de restrição do DNA mitocondrial. No estudo de Esteve-Zarzoso e colaboradores (2000), na região de El Penedès (Espanha), foram encontrados 22 perfis de mtDNA a partir de 68 isolados de *S. cerevisiae* presentes nas fermentações espontâneas dos vinhos, mesmo número de perfis indígenas encontrado no presente trabalho. No entanto, o percentual de perfis identificados no total de isolados indígenas de *S. cerevisiae* encontrados por esses autores (32,35%) foi superior ao do presente trabalho (12%). Ponzzes-Gomes e colaboradores (2014) encontraram 155 isolados de *S. cerevisiae* de mostos fermentados de uvas do Vale do São Francisco, e identificaram quatro perfis diferentes de restrição do mtDNA como pertencentes a linhagens indígenas, e um perfil pertencente a uma linhagem de *S. cerevisiae* comercial. Desses 155 isolados, 71 corresponderam às *S. cerevisiae* indígenas e 64 ao perfil de restrição do mtDNA da *S. cerevisiae* comercial. Esses autores encontraram um número menor de perfis de mtDNA de *S. cerevisiae* indígenas do que o número encontrado no presente estudo. No trabalho de Ponzzes-Gomes e colaboradores (2014), as leveduras foram isoladas no ano de 2008, e na época o vinhedo a partir do qual as uvas foram colhidas tinha aproximadamente três anos de plantio. Esse tempo pode não ter sido suficiente para a colonização e adaptação de um número maior de linhagens indígenas de *S. cerevisiae* nas uvas. De acordo com Pretorius (2000) e Schuller e colaboradores (2005), um dos fatores que influenciam na microbiota de leveduras nas uvas é a idade da vinha. Schuller e colaboradores (2005) estudaram a ecologia das linhagens de *S. cerevisiae* de um vinhedo da região dos vinhos verdes em

Portugal, por três anos consecutivos. Das 54 fermentações espontâneas estudadas, os autores obtiveram 1.620 isolados de *S. cerevisiae*, com 297 perfis diferentes de DNA mitocondrial. Possivelmente o que explicaria a quantidade de perfis distintos de DNA mitocondrial encontrados são esses vinhedos já serem bem estabelecidos na região e o fato das fermentações terem sido acompanhadas em várias épocas distintas (três anos no total). Ortiz e colaboradores (2013) isolaram 240 *Saccharomyces* spp. de diferentes estágios da fermentação de vinhos produzidos numa adega familiar, localizada na Espanha, e caracterizaram essas leveduras pela análise de restrição do DNA mitocondrial. Os autores encontraram 21 perfis moleculares diferentes. Mercado e colaboradores (2011) estudaram a diversidade de *S. cerevisiae* encontrada nos vinhedos de Malbec numa região chamada “zona alta del Río Mendoza” na Argentina. Os autores encontraram dentre os 590 isolados dessa espécie mais de 190 perfis de mtDNA diferentes. Os autores também identificaram dois perfis de mtDNA referentes a linhagens comerciais utilizadas na região, isoladas a partir de dornas de fermentações espontâneas. Capece e colaboradores (2012) encontraram 15 perfis de mtDNA diferentes de *S. cerevisiae* associados a fermentações espontâneas de vinho de uma região da Itália denominada “heroic vine-growing area”.

No presente trabalho, as uvas da variedade Cabernet Sauvignon apresentaram a maior ocorrência de diferentes perfis de restrição do mtDNA para as *S. cerevisiae* indígenas, com 10 perfis distintos (figura 10), sendo o que prevaleceu foi o perfil P22, com 5 isolados. No entanto, foi a variedade de uva com o menor número de isolados encontrados 16 (8,7%). As uvas da variedade Chenin blanc apresentaram seis perfis a partir de 57 isolados de *S. cerevisiae* encontrados (31%), sendo o que prevaleceu foi o perfil P12, com 31 isolados, correspondendo a mais da metade dos isolados dessa variedade de uva (54,4%). As uvas da variedade Syrah apresentaram seis perfis distintos a partir dos 44 isolados de *S. cerevisiae* encontrados (23,9%), sendo o que prevaleceu foi o perfil P1, com 12 isolados, correspondendo a 27,3% dos isolados dessa variedade de uva. Uvas da variedade Tempranillo apresentaram cinco perfis distintos a partir dos 50 isolados de *S. cerevisiae* encontrados (27,2%), sendo o que prevaleceu foi o perfil P6, com 30 isolados, correspondendo a 60% dos isolados dessa variedade de uva. As uvas da variedade Petit Verdot apresentaram cinco perfis distintos a partir dos 17 isolados de *S. cerevisiae* encontrados (9,2%), sendo o que prevaleceu foi o perfil P15, com 7 isolados, correspondendo a 41,2% dos isolados dessa variedade de uva.

O maior número de isolados de linhagens comerciais de *S. cerevisiae*, de um total de 75 isolados (29%) entre os 259 isolados de *S. cerevisiae* de todo o estudo, foi encontrado na Fazenda Ducos com 70 isolados (93,3%), sendo encontrados 18 isolados (linhagem comercial C1) na variedade de uva Syrah, 22 isolados (linhagem comercial C1) na variedade de uva Petit Verdot e 30 isolados (linhagem comercial C3/C4) na variedade de uva Cabernet Sauvignon; o menor número de isolados comerciais de *S. cerevisiae* foi encontrado na Fazenda Vinibrasil com 5 isolados (6,7%), todos representando a linhagem comercial de *S. cerevisiae* C1 e isolados da variedade de uva Syrah. Em todas as fazendas estudadas no presente trabalho, os resíduos do processo de vinificação são reutilizados e espalhados no solo para disponibilização e retorno de nutrientes ao mesmo. Nesse sentido, os resultados encontrados sugerem que as linhagens comerciais C1 e C3/C4 estão adaptadas aos vinhedos das regiões estudadas, onde foram isoladas, principalmente na Fazenda Ducos na qual foram isoladas aproximadamente 93% dessas linhagens. A presença de linhagens comerciais em fermentações espontâneas de vinho, como verificado no presente trabalho, já foi previamente relatada por vários autores (ROSINI, 1984; CONSTANTÍ et al., 1998; SANTAMARÍA et al., 2005; MERCADO et al., 2011). Embora os perfis de restrição do mtDNA das leveduras comerciais C1 (perfil P23) e C3/C4 (perfil 25) tenham sido encontrados nos isolamentos das leveduras na fazenda Ducos, no presente momento eles não as utilizam nas suas vinificações, entretanto em anos anteriores utilizaram diversas leveduras comerciais, dentre as quais essas poderiam ter sido utilizadas e com isso justificado a permanência dos mesmos no vinhedo até o momento. No caso da fazenda Vinibrasil, onde foi encontrado nos isolamentos das leveduras o perfil P23 (levedura comercial C1), uma das leveduras comerciais utilizadas por essa fazenda é a levedura comercial C1, com isso justificando seu aparecimento nesse ambiente de vinhedo.

A partir dos resultados de análise da restrição do DNA mitocondrial, foram selecionados isolados de cada perfil de restrição para a realização das microfermentações em mosto sintético. Quanto maior o percentual dos isolados encontrados de um determinado perfil, maior foi o número de isolados selecionados para os testes das microfermentações. Esse número variou de um a nove isolados escolhidos em relação a cada um dos perfis das linhagens de *S. cerevisiae* obtidas.

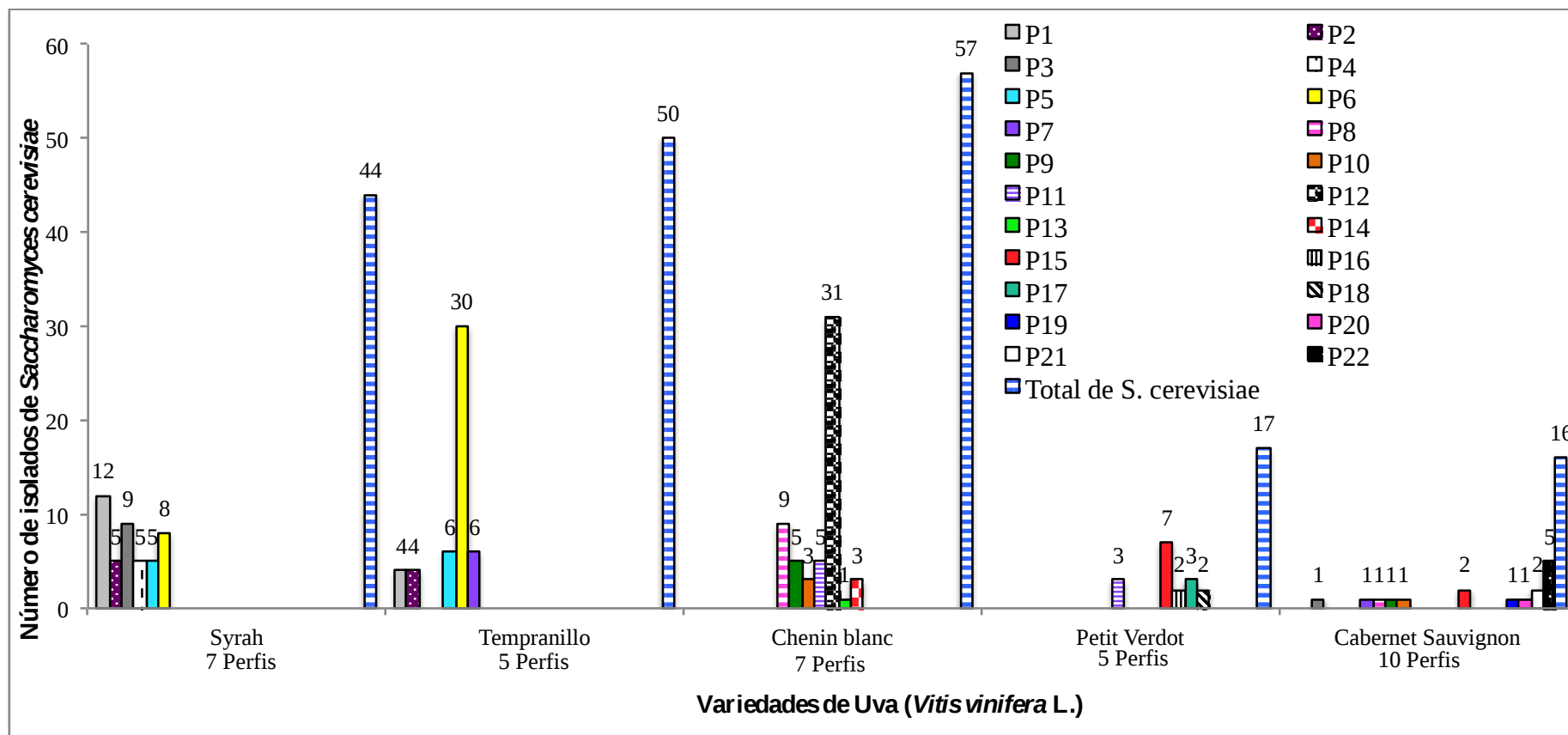


Figura 10. Número de isolados de cada perfil de restrição do DNA mitocondrial das *Saccharomyces cerevisiae* indígenas do mosto fermentado de uvas do Vale do São Francisco, de acordo com as variedades de uva estudadas.

3.1.2 Identificação das leveduras não-*Saccharomyces*

Por meio da metodologia padrão, empregando-se testes fisiológicos, as leveduras não-*Saccharomyces* (109 isolados) foram agrupadas em 23 grupos diferentes. Todos os isolados de cada grupo fisiológico foram caracterizados molecularmente utilizando-se o iniciador EI1. Isolados com o mesmo padrão de bandas foram considerados como pertencentes à mesma espécie de levedura (ROSA et al., 2007). Nas figuras 11 a 13 estão representados os perfis de bandas dos amplicons utilizando-se o iniciador EI1. Um representante de cada perfil diferente foi utilizado para a técnica de sequenciamento para a identificação da espécie. De acordo com os resultados do sequenciamento da região ITS-5.8S e dos domínios D1/D2 da subunidade maior do DNAr, os 109 isolados de não-*Saccharomyces* foram identificados como correspondentes às seguintes espécies: *Pichia kudriavzevii* (77,1%), *P. membranifaciens* (3,7%), *P. occidentalis* (0,9%), *P. manshurica* (0,9%), *Meyerozyma caribbica* (1,8%), *M. guilliermondii* (0,9%), *Zygosaccharomyces bailii* (1,8%), *Torulaspora delbrueckii* (0,9%) e *Schizosaccharomyces pombe* (12%), totalizando nove espécies de leveduras em cinco gêneros diferentes (Tabela 3). A proporção de cada espécie encontrada nos diversos mosto de fermentação das variedades de uva trabalhadas (Syrah, Tempranillo, Chenin blanc, Petit Verdot e Cabernet Sauvignon) também variou conforme mostra na figura 13, assim como a porcentagem encontrada em cada fazenda onde ocorreram os isolamentos (Tabela 3), sendo na fazenda Ouro Verde onde a espécie *Pichia kudriavzevii* foi isolada numa maior porcentagem (34,86%).

Tabela 3 – Porcentagem de cada espécie de não-*Saccharomyces* identificada e isolada em cada fazenda do Vale do São Francisco nesse estudo (Fazenda Ouro Verde; Fazenda Vinibrasil; Fazenda Botticelli; Fazenda Ducos).

Espécies	Ouro Verde	Vinibrasil	Botticelli	Ducos	% da espécie
<i>Pichia kudriavzevii</i>	34,86	17,43	11,93	12,84	77,1
<i>Pichia occidentalis</i>	-----	-----	-----	0,92	0,9
<i>Pichia membranifaciens</i>	-----	0,92	2,75	-----	3,7
<i>Pichia manshurica</i>	-----	-----	-----	0,92	0,9
<i>Meyerozyma caribbica</i>	1,83	-----	-----	-----	1,8
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-----	0,92	-----	-----	0,9
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	-----	-----	1,83	-----	1,8
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	0,92	-----	-----	-----	0,9
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0,92	-----	8,26	2,75	11,9
% das espécies (por fazenda)	38,53	19,27	24,77	17,43	100

Diferentemente de regiões de clima temperado, as espécies de não-*Saccharomyces* predominantes nesse estudo (região tropical semiárida) foram *P. kudriavzevii* e *S. pombe*. Essas são leveduras que crescem em altas temperaturas, sendo assim podendo estar associadas ao microclima da região estudada. As espécies de não-*Saccharomyces* predominantes na superfície das uvas, conseqüentemente nas etapas iniciais da fermentação, em regiões tradicionais na vitivinicultura, são geralmente *Hanseniaspora uvarum* (numa maior proporção), uma levedura apiculata, e leveduras oxidativas pertencentes aos gêneros *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Kluyveromyces* (FLEET; HEARD, 1993; ESTEVE-ZARZOSO et al., 2010; LI et al., 2010; SETTANNI et al. 2012; TRISTEZZA et al., 2013; SUN et al., 2014). Entretanto, no trabalho de Ponzzes-Gomes e colaboradores (2014) isolaram e identificaram leveduras do mosto fermentado espontaneamente de cinco variedades de uvas colhidas em 2008 e utilizadas para vinho no Vale do São Francisco (mesma região do presente estudo, no entanto, em apenas uma fazenda colhida). As espécies identificadas foram: *S. cerevisiae* (encontrada numa maior porcentagem), *Rhodotorula mucilaginosa*, essa sendo a não-*Saccharomyces* encontrada numa maior porcentagem, seguida por *Pichia kudriavzevii* (= *Issatchenkia orientalis*), *Candida parapsilosis*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Kloeckera apis*, *P. manshurica*, *C. orthopsilosis* e *C. zemplinina*. Nesse estudo pode-se isolar leveduras apículas (numa porcentagem muito baixa) e oxidativas também.

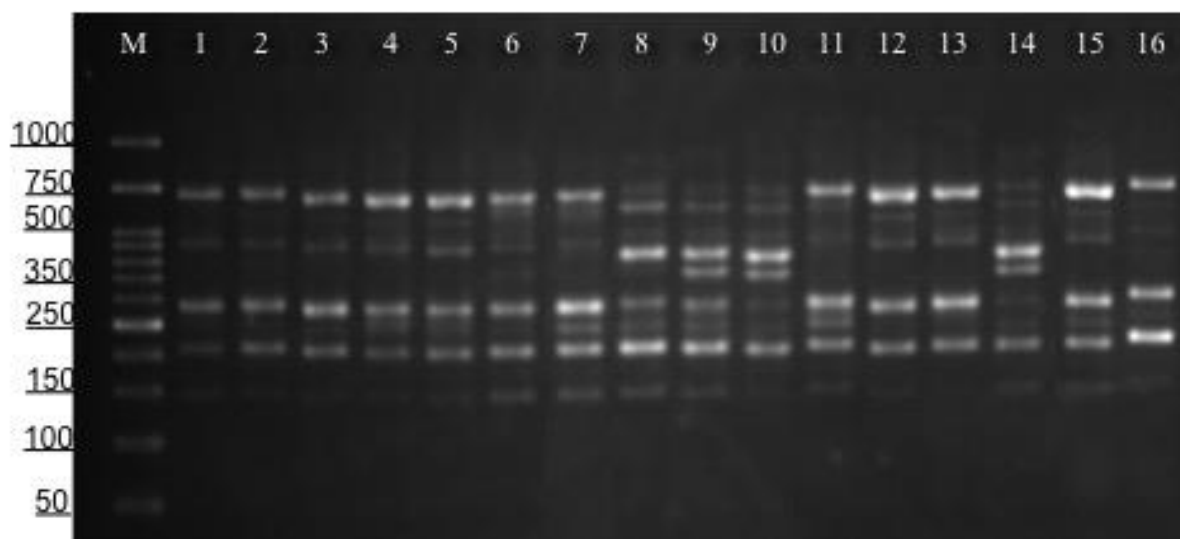


Figura 11. Perfil de bandas dos amplicons obtidos utilizando-se o iniciador EI1 com os isolados de leveduras não-*Saccharomyces* do mosto fermentado das uvas do Vale do São Francisco. M: Marcador Molecular 1kb ladder. Leveduras 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 11; 12; 13; 15; 16: *Pichia kudriavzevii*. Leveduras 8; 9; 10; 14: *Pichia membranifaciens*.

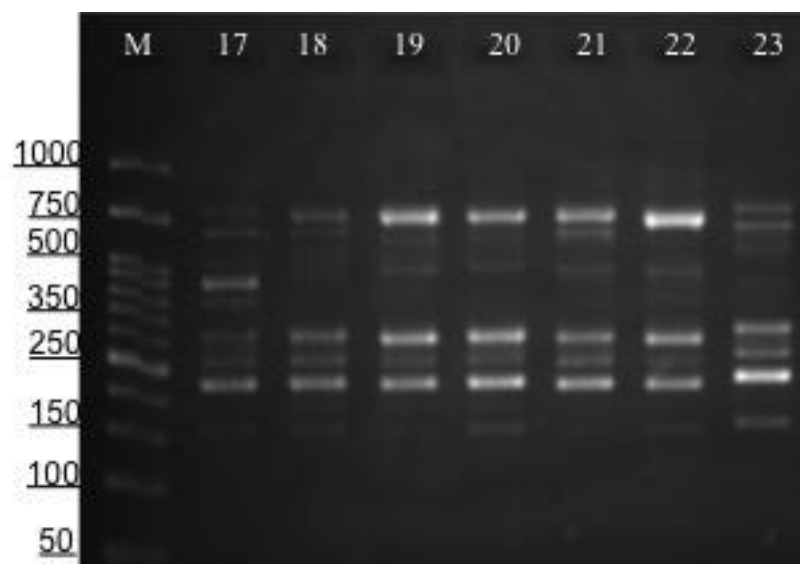


Figura 12. Perfil de bandas dos amplicons obtidos utilizando-se o iniciador EI1 com os isolados de não-*Saccharomyces* do mosto fermentado das uvas do Vale do São Francisco. M: Marcador Molecular 1kb ladder. Levedura 17: *Pichia manshurica*. Leveduras 18; 19; 20; 21; 22; 23: *Pichia kudriavzevii*.

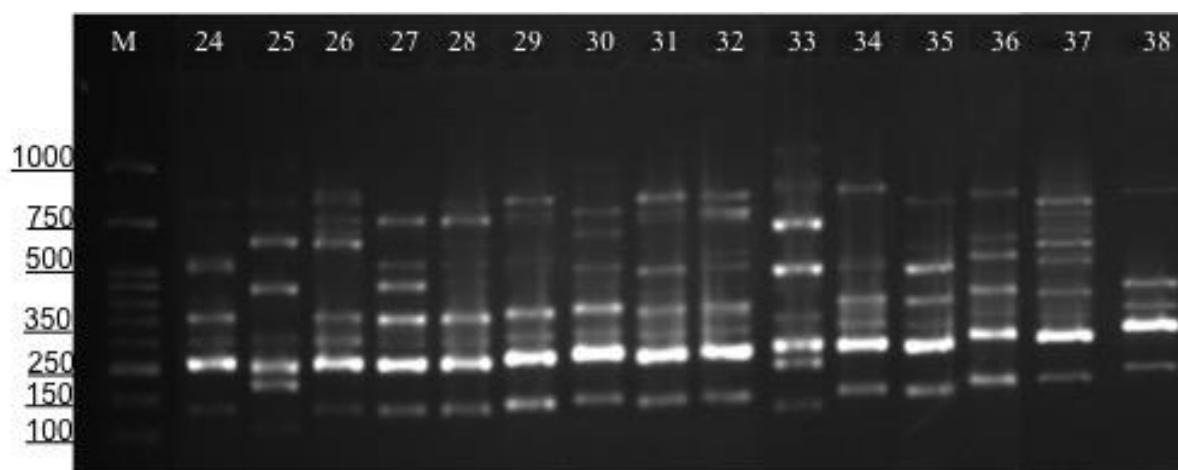


Figura 13. Perfil de bandas dos amplicons obtidos utilizando-se o iniciador EI1 com os isolados de não-*Saccharomyces* do mosto fermentado das uvas do Vale do São Francisco. M: Marcador Molecular 1kb ladder. Leveduras 24; 28; 29; 31; 32; 38: *Pichia kudriavzevii*. Leveduras 25; 33: *Meyerozyma carbbica*. Levedura 26: *M. guillermundii*. Leveduras 27; 35: *Zygosaccharomyces bailii*. Levedura 30: *Pichia occidentalis*. Levedura 34: *Torulaspora delbrueckii*. Leveduras 36; 37: *Schizosaccharomyces pombe*.

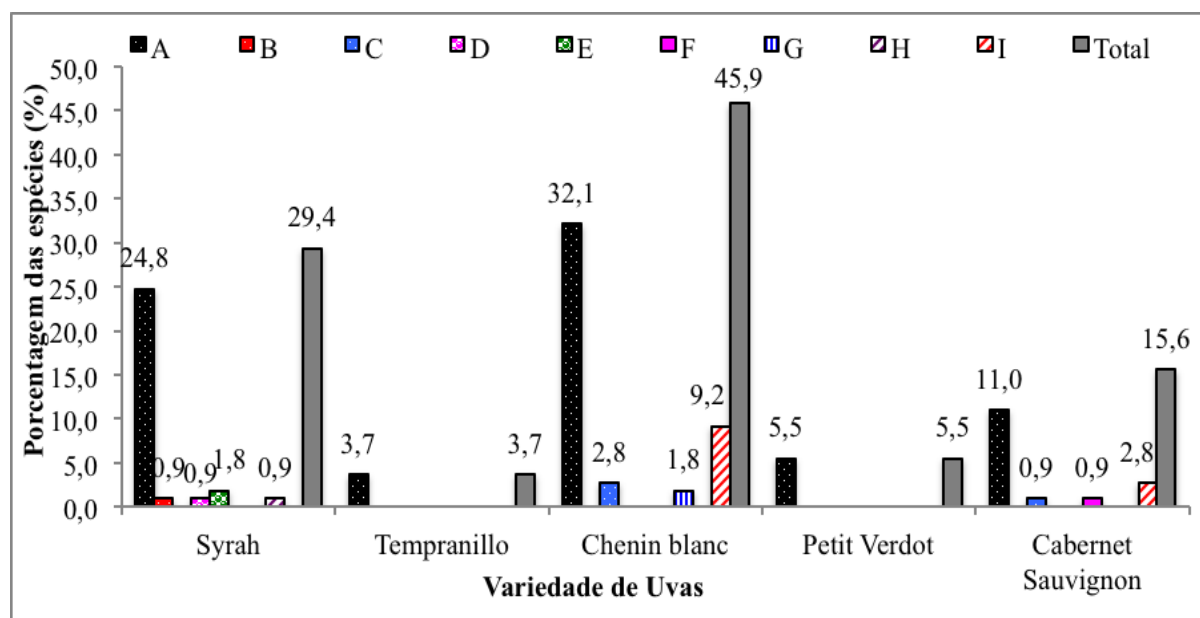


Figura 14. Porcentagem das espécies de não-*Saccharomyces* encontradas nos mostos fermentados de uva de cada variedade estudada (Syrah, Tempranillo, Chenin blanc, Petit Verdot e Cabernet Sauvignon). A = *Pichia kudriavzevii*; B = *P. occidentalis*; C = *P. membranifaciens*; D = *P. manshurica*; E = *Meyerozyma caribbica*; F = *M. guilliermondii*; G = *Zygosaccharomyces bailii*; H = *Torulaspora delbrueckii*; I = *Schizosaccharomyces pombe*; Total = Total de espécies encontradas na variedade de uva correspondente.

Conforme é mostrada na figura 14, a única espécie de não-*Saccharomyces* que foi isolada em todos os mostos de fermentação das uvas do Vale do São Francisco estudadas foi *Pichia kudriavzevii*, sendo isolada numa maior porcentagem na variedade de uva Chenin blanc (32,1%) e em segundo na Syrah (24,8%). As demais espécies foram isoladas numa menor porcentagem e não encontradas em todos os mostos de fermentação.

Pichia kudriavzevii (= *Issatchenkia orientalis*) é uma espécie de levedura ascomicética já relatada como encontrada em outros substratos e processos, como em suco de frutas, frutas vermelhas, cerveja, fezes humanas, moscas do gênero *Drosophila* spp., fermentações industriais, exsudatos de árvores e água do mar, estando associada com humanos e animais (KURTZMAN et al., 2011). Essa foi a espécie não-*Saccharomyces* isolada em maior porcentagem no presente trabalho, representando 77,1% do total desse grupo de leveduras. Wang e Liu (2013) isolaram *P. kudriavzevii* em fermentações espontâneas de uva da variedade Muscat blanc em Jingyang (China), e esta espécie foi a segunda mais frequentemente encontrada ao final da fermentação, sendo isolada com menor frequência somente em relação à *S. cerevisiae*. *Pichia kudriavzevii* foi encontrada também em seis diferentes variedades de uva de vinho comumente utilizadas na Índia (CHAVAN et al., 2009). Li e colaboradores (2010) e Di Maro e colaboradores (2007), respectivamente, também

isolaram essa espécie em duas variedades diferentes de uvas tintas na China e em fermentações espontâneas de uma variedade de uva na Itália. Settanni e colaboradores (2012) e Tristezza e colaboradores (2013) também obtiveram essa levedura em fermentações espontâneas de uvas na Itália. Clemente-Jimenez e colaboradores (2004) encontraram *P. kudriavzevii* em fermentações espontâneas de seis variedades de mosto de uva. Esses autores avaliariam o potencial fermentativo desta levedura, e concluíram que a mesma apresenta ótimos resultados quanto à produção de álcoois superiores, com resultados inferiores apenas em relação à *S. cerevisiae* e *H. uvarum*. Essa espécie também foi encontrada por Clavijo e colaboradores (2010) em fermentações espontâneas de uvas de diferentes variedades durante as safras de 2006 e 2007 na região de “Serranía de Ronda” (Málaga, Espanha). Combina e colaboradores (2005) isolaram, durante fermentações espontâneas de três mostos da variedade Malbec na Argentina, essa mesma espécie. De acordo com o contexto apresentado, *P. kudriavzevii* parece estar, portanto, associada a uvas utilizadas na viticultura. No entanto, o papel ecológico desta levedura em uvas ou fermentações vinícolas é ainda desconhecido, e necessita de melhores investigações.

Schizosaccharomyces pombe é uma espécie ascomicética que se reproduz por fissão binária (KURTZMAN et al., 2011). Essa levedura é também encontrada em fermentações para a produção de vinhos, principalmente por ser uma espécie resistente a altas concentrações de etanol (SWIEGERS et al., 2005; PRETORIUS, 2000). Além de processos fermentativos, essa espécie também já foi isolada a partir de vinhedo como no trabalho de Romano e Suzzi (1993). A resistência ao etanol por esta levedura é interessante, já que dentre as não-*Saccharomyces* encontradas no presente estudo, *S. pombe* apresentou a segunda maior porcentagem de ocorrência (12%), possivelmente pela capacidade de suportar elevadas concentrações de álcool.

Pichia occidentalis foi também uma espécie obtida no presente trabalho. Di Maro e colaboradores (2007) isolaram também essa espécie em fermentações espontâneas de uvas em Campania (Itália). Bezerra-Bussoli e colaboradores (2013) ao estudarem a ocorrência de leveduras em superfícies de uvas e mostos das variedades Isabel, Bordeaux e Cabernet Sauvignon de uma vinícola localizada no Brasil, isolaram diversas espécies de leveduras, entre elas *P. occidentalis*

Pichia membranifaciens já foi isolada em mosto de uvas, solo de vinhedo, cerveja e fezes, dentre outros substratos (KURTZMAN et al., 2011). Na Argentina, Combina e colaboradores (2005) isolaram *P. membranifaciens* em baixa frequência em três mostos da

variedade de uva Malbec durante fermentações espontâneas. Essa espécie também foi isolada de um ambiente de vinícola por Chavan e colaboradores (2009) a partir de diferentes variedades de uvas de vinho comumente usadas na Índia. Bourret e colaboradores (2013) isolaram leveduras a partir de uvas colhidas de um vinhedo utilizado para pesquisas da Universidade Estadual de Washington em Prosser, Estados Unidos. Nesse trabalho, os autores identificaram 53 espécies, dentre essas *P. membranifaciens* e *Meyerozyma caribbica*, também encontradas no presente trabalho. *Meyerozyma caribbica* (= *P. caribbica*) é encontrada em vários tipos de substratos, sendo considerada uma espécie de ampla distribuição geográfica (KURTZMAN, 2011a).

Pichia manshurica é uma espécie ascomicética descrita como associada a fermentações naturais (KURTZMAN, 2011a). No presente trabalho, essa levedura foi encontrada em baixa frequência. Tristezza e colaboradores (2013) isolaram diversas espécies de leveduras na Região de Apulia (Itália) a partir de fermentações espontâneas, incluindo *P. manshurica*. Os autores mostraram que essa espécie era capaz de produzir histamina e cadaverina durante a fermentação do mosto. Saez e colaboradores (2011) isolaram leveduras deterioradoras e produtoras de aromas voláteis indesejáveis em vinhos tintos e brancos do norte da Patagônia (Argentina), sendo que as únicas espécies obtidas foram *S. cerevisiae* e *P. manshurica*. Ponzzes-Gomes e colaboradores (2014) também isolaram *P. manshurica* dos mostos fermentados de uvas produtoras de vinho no Vale do São Francisco.

Meyerozyma guilliermondii foi obtida em baixa frequência no presente trabalho. Esta espécie também já foi isolada por Clavijo e colaboradores (2010) em fermentações espontâneas de uva de diferentes variedade durante as safras de 2006 e 2007 na região de “Serranía de Ronda” (Málaga, Espanha). Francesca e colaboradores (2014) isolaram *M. guilliermondii* de fermentações para a produção de vinhos tintos das uvas “Aglanico di Taurasi” sujeitos à maceração pós-fermentação na região de Taurasi (Itália). Portanto, essa espécie e as outras encontradas nesse estudo (*Pichia membranifaciens*, *P. occidentalis*, *P. manshurica*, *Meyerozyma caribbica*, *Zygosaccharomyces bailii* e *Torulaspora delbrueckii*) devem apresentar uma ocorrência transitória durante o processo de fermentação, já que muitas das leveduras não-*Saccharomyces* são sensíveis ao álcool produzido durante a fermentação (FLEET, 2008).

Zygosaccharomyces bailii é uma espécie ascomicética isolada de vários processos industriais, incluindo fermentações para a produção de vinhos (KURTZMAN et al., 2011; SWIEGERS et al., 2005). Esteve-Zarzoso e colaboradores (2010) isolaram essa levedura na

fermentação dos vinhos Granacha na Espanha durante a safra de 2006. Li e colaboradores (2010), ao investigarem a diversidade de leveduras de três variedades de uvas cultivadas em quatro regiões vitícolas da China, isolaram 17 espécies diferentes de leveduras, incluindo *Z. bailii*. Essa espécie foi também isolada de fermentações espontâneas de diversas variedades de uva na região de “Serranía de Ronda” em Málaga (Espanha) (CLAVIJO et al., 2010). Nos trabalhos de Romano e Suzzi (1993) e de Fleet (2000) essa espécie foi obtida a partir de ambiente de vinhedo. Esta levedura está geralmente associada com processos de deterioração de alimentos e bebidas (JAMES; STRATFORD, 2011). A ocorrência de *Z. bailii* associada a uvas indica que esta espécie caracterizada como deterioradora está também associada à superfície dessas frutas, podendo ser encontrada, a partir dessas, no processo fermentativo para a produção de vinhos.

Torulaspora delbrueckii é uma levedura generalista amplamente associada aos alimentos e às bebidas fermentadas (KURTZMAN, 2011b). Essa levedura foi encontrada em baixa frequência no presente trabalho. Di Maro e colaboradores (2007) isolaram essa espécie a partir de fermentações espontâneas feitas com uvas brancas da variedade Catalanesca em Campania (Itália). Vários outros estudos mostraram a ocorrência de *T. delbrueckii* em baixas frequências durante a produção de vinhos (CLAVIJO et al., 2010; PÉREZ-MARTÍN et al., 2014; SUN; LIU, 2014). Bely e colaboradores (2008) mostraram que fermentações mistas utilizando *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii* produziam um equilíbrio melhor do “flavour” em vinhos doces do que fermentações utilizando somente *S. cerevisiae*. Portanto, torna-se interessante o estudo do potencial enológico destas linhagens de *T. delbrueckii* isoladas de fermentações para a produção de vinho.

3.2 Seleção das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* não produtoras do gás sulfeto de hidrogênio (H₂S)

Dos 184 isolados indígenas de *S. cerevisiae*, 46 não produziram H₂S no meio Bismuth Sulfite Agar (BSA) (Figuras 15 e 16). As seis linhagens comerciais de *S. cerevisiae* também foram testadas e apenas a levedura C1 (Maurivin AWRI 796) não produziu H₂S.

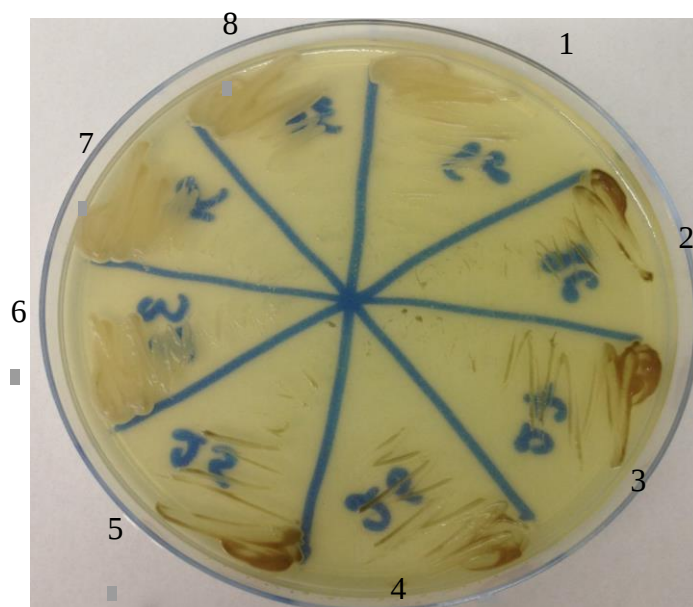


Figura 15. Isolados de *Saccharomyces cerevisiae* negativos (cultura de coloração creme claro) e positivos (culturas de coloração marrom) para a produção de gás H₂S. Códigos: 1 - linhagem indígena 29; 6 - linhagem indígena 32; 7 - linhagem indígena 31; 8 - linhagem indígena 30; 2 - linhagem indígena 28; 3 - linhagem indígena 27; 4 - linhagem indígena 26; 5 - linhagem indígena 25.

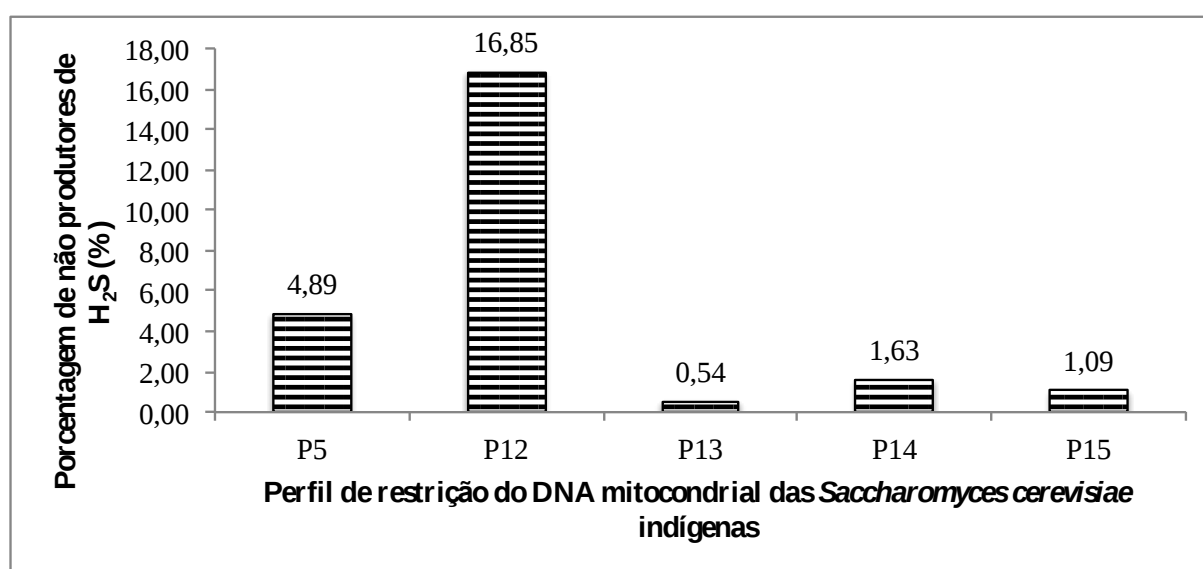


Figura 16. Porcentagem dos isolados indígenas de *Saccharomyces cerevisiae* negativos para a produção de H₂S com seus respectivos perfis de restrição do DNA mitocondrial.

A linhagem de *S. cerevisiae* com o perfil P12 de restrição do mtDNA não produziu H₂S, e representou a maior porcentagem (16,85%) dos isolados dotados dessa característica fisiológica (Figura 16). Este perfil P12 foi um dos perfis encontrados entre as linhagens indígenas de *S. cerevisiae* com maior frequência. Além das leveduras com o perfil P12, outros perfis possuíam representantes que também não produziram esse gás, como no perfil P5 (81,8% dos isolados não produziram), no perfil P13 (100% dos isolados não produziram), perfil P14 (100% dos isolados não produziram) e no perfil P15 (22,2% dos isolados não produziram). Todos os demais perfis apresentaram em 100% de seus isolados a produção do gás H₂S. Os isolados não-produtores de H₂S são candidatos a testes para a produção de uma vez que não sintetizam esse composto indesejável que pode contribuir para a diminuição da qualidade sensorial da bebida. Outros autores também analisaram a produção de H₂S por *S. cerevisiae* como um critério para a seleção de linhagens indígenas para a produção de vinho. Mauriello e colaboradores (2009) identificaram, dentre 36 linhagens de *S. cerevisiae*, quatro linhagens com baixa produção de sulfeto de hidrogênio, 23 com produção média e nove com alta produção desse gás. Capece e colaboradores (2013a) selecionaram *S. cerevisiae* indígenas de vinhos envelhecidos por um ano em dez diferentes vasos de terracota de uma vinícola na Geórgia (União Europeia). Das 13 linhagens encontradas, oito produziram H₂S em alta quantidade, e cinco apresentaram uma produção média. No entanto, no presente trabalho, linhagens produtoras de H₂S também foram selecionadas para a produção de vinhos em escala de laboratório, principalmente em função dos resultados dos parâmetros fermentativos analisados, tais como o consumo de glicose e frutose, produção de etanol, glicerol e ácido acético e rendimento em etanol. Além disso, todas as linhagens comerciais utilizadas neste trabalho produziram este gás H₂S, com exceção para a linhagem C1 que não o produziu, entretanto esse teste realizado foi qualitativo (em placa), com isso havendo a necessidade de realizar análises quantitativas para se ter valores exatos dessa produção e poder assim mensurar corretamente, pois talvez a produção constatada no teste qualitativo seja uma pequena produção num teste quantitativo e não afete na produção dos vinhos, fato esse possa ser justificado a utilização destas linhagens comerciais (C2, C3, C4, C5, C6) na produção de vinhos. Por essa razão, não foi usado esse teste como característica para a seleção das linhagens indígenas para a produção dos vinhos.

3.3 Microfermentações das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Dos 259 isolados de *S. cerevisiae* encontrados, 80 indígenas e seis linhagens comerciais foram utilizadas nos experimentos de microfermentação em mosto sintético (Tabela 4). O número de isolados escolhido para realizar as microfermentações foi de acordo com o número de perfis de mtDNA das linhagens de *S. cerevisiae* encontradas no presente estudo. A partir dos resultados obtidos nas microfermentações, as leveduras que obtiveram os melhores indicadores foram utilizadas para a produção dos vinhos.

Tabela 4 – Média das concentrações residuais de glicose e frutose (g/L), e concentrações de etanol (% v/v), glicerol e ácido acético (g/L) produzidos, além do rendimento em etanol (%), de acordo com o tempo de fermentação (h) para cada linhagens de *S. cerevisiae* testada nos ensaios de microfermentação em mosto sintético. São mostrados também os perfis de restrição do DNA mitocondrial e o resultado da produção de H₂S para cada linhagem.

Código	mtDNA	Tempo (h)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	Etanol (%v/v)	Rendimento em etanol (%)	Glicerol (g/L)	Ácido Acético (g/L)	H ₂ S *
9	P1	96h	1,3 ^a	4,26 ^a	9,4 ^b	6,7 ^b	9,96 ^a	1,1 ^e	P
10	P1	48h	1,12 ^a	4,51 ^a	10,2 ^a	7,2 ^b	8,82 ^b	1,14 ^e	P
12	P1	48h	0,53 ^b	3,65 ^b	10,3 ^a	9,9 ^a	10,23 ^a	1,34 ^c	P
13	P1	48h	0,56 ^b	3,37 ^b	9,8 ^b	10,2 ^a	10,13 ^a	1,27 ^d	P
96	P1	48h	1,27 ^a	3,7 ^b	10,9 ^a	8,7 ^b	9,88 ^a	1,07 ^e	P
287	P1	144h	2,63 ^a	4,05 ^a	6,49 ^d	5,5 ^b	8,41 ^b	1 ^f	P
14	P2	48h	1,18 ^a	3,87 ^b	9,68 ^b	7,6 ^b	7,16 ^c	0,51 ^h	P
15	P2	144h	0 ^b	3,02 ^b	9,29 ^b	12,2 ^a	6,57 ^d	0,65 ^h	P
17	P2	144h	0 ^b	3,07 ^b	10,03 ^a	12,9 ^a	6,04 ^d	0,71 ^g	P
92	P2	144h	0 ^b	2,89 ^b	8,08 ^c	11,1 ^a	6,83 ^d	0,79 ^g	P
94	P2	144h	0 ^b	2,95 ^b	9,76 ^b	13,0 ^a	5,98 ^d	0,73 ^g	P
95	P2	144h	0 ^b	3,2 ^b	10,63 ^a	13,2 ^a	6,57 ^d	0,75 ^g	P
19	P3	120h	0,68 ^a	4,68 ^a	9,24 ^b	6,8 ^b	7,55 ^c	1,02 ^e	P
54	P3	144h	0,65 ^a	4,11 ^a	7,9 ^c	6,7 ^b	7,04 ^d	1,3 ^d	P
57	P3	72h	1,09 ^a	4,24 ^a	10,59 ^a	7,8 ^b	7,95 ^c	0,78 ^g	P
292	P3	168h	0 ^b	3,18 ^b	7,28 ^d	9,1 ^b	6,37 ^d	1,55 ^b	P
24	P4	96h	0 ^b	3,07 ^b	9,04 ^b	11,7 ^a	7,22 ^c	0,85 ^f	P
25	P4	144h	0 ^b	3,21 ^b	9,69 ^b	11,9 ^a	6,19 ^d	0,82 ^g	P
26	P4	144h	0 ^b	3,43 ^b	10,61 ^a	12,4 ^a	6,71 ^d	0,92 ^f	P
30	P5	120h	0 ^b	3,24 ^b	10,36 ^a	12,6 ^a	7,2 ^c	1,08 ^e	N
32	P5	144h	0 ^b	3,18 ^b	8,7 ^c	10,8 ^a	6,22 ^d	1,02 ^f	N
93	P5	144h	0 ^b	3,11 ^b	9,41 ^b	11,9 ^a	5,64 ^d	0,95 ^f	N
107	P5	144h	0 ^b	2,96 ^b	9,51 ^b	12,7 ^a	6,24 ^d	0,98 ^f	N
81	P6	72h	1,11 ^a	4,51 ^a	9,98 ^b	7,0 ^b	9,44 ^b	1,17 ^e	P
82	P6	48h	1,18 ^a	4,14 ^a	9,88 ^b	7,4 ^b	10,81 ^a	1,39 ^c	P
87	P6	48h	1,15 ^a	6,55 ^a	10,25 ^a	5,3 ^b	10,09 ^a	1,26 ^d	P
99	P6	120h	0 ^b	2,42 ^b	9,34 ^b	15,2 ^a	8,09 ^c	0,99 ^f	P
100	P6	120h	0 ^b	2,29 ^b	8,98 ^b	15,5 ^a	8,64 ^b	1,09 ^e	P
111	P6	72h	1,38 ^a	4,77 ^a	9,62 ^b	6,2 ^b	10,08 ^a	1,21 ^d	P
115	P6	48h	1,1 ^a	6,02 ^a	10,48 ^a	5,9 ^b	9,77 ^a	1,21 ^d	P
122	P6	48h	1,1 ^a	5,82 ^a	10,12 ^a	5,8 ^b	10,54 ^a	1,37 ^c	P
125	P6	48h	1,2 ^a	4,18 ^a	10,67 ^a	7,8 ^b	9,23 ^b	1,09 ^e	P

Tabela 4 – Continuação.

Código	mtDNA	Tempo (h)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	Etanol (%v/v)	Rendimento em etanol (%)	Glicerol (g/L)	Ácido Acético (g/L)	H ₂ S *
117	P7	48h	1,14 ^a	5,14 ^a	9,92 ^b	6,2 ^b	7,88 ^c	0,81 ^g	P
118	P7	120h	0 ^b	2,34 ^b	9,26 ^b	15,6 ^a	7,12 ^c	0,79 ^g	P
124	P7	48h	1,1 ^a	5,49 ^a	9,89 ^b	6,1 ^b	7,51 ^c	0,77 ^g	P
144	P8	96h	0,62 ^b	4,7 ^a	9,03 ^b	7,2 ^b	8,61 ^b	0,57 ^h	P
155	P8	144h	0 ^b	2,9 ^b	5,76 ^d	8,0 ^b	7,66 ^c	1,27 ^d	P
156	P8	168h	0 ^b	4,36 ^a	7,85 ^c	8,8 ^b	6,65 ^d	1,33 ^d	P
293	P8	96h	0,57 ^b	3,5 ^b	8,45 ^c	8,2 ^b	9,07 ^b	0,85 ^f	P
127	P9	120h	0 ^b	2,49 ^b	8,54 ^c	13,5 ^a	8,24 ^c	0,99 ^f	P
129	P9	120h	0 ^b	2,49 ^b	8,85 ^c	14,0 ^a	8,24 ^c	0,91 ^f	P
131	P9	120h	0 ^b	2,48 ^b	9,48 ^b	15,1 ^a	7,88 ^c	0,91 ^f	P
247	P9	144h	0 ^b	4,79 ^a	7,6 ^c	6,6 ^b	6,51 ^d	0,9 ^f	P
132	P10	144h	0 ^b	3,04 ^b	9,28 ^b	12,0 ^a	6,56 ^d	1,26 ^d	P
133	P10	144h	0 ^b	3,21 ^b	9,06 ^b	11,2 ^a	7,46 ^c	1,06 ^e	P
135	P10	144h	0 ^b	3,8 ^b	7,76 ^c	8,0 ^b	6,37 ^d	1,35 ^c	P
295	P10	144h	0 ^b	2,18 ^b	6,63 ^d	12,75 ^a	7,32 ^c	1,81 ^a	P
136	P11	144h	0 ^b	2,92 ^b	9,17 ^b	12,4 ^a	6,44 ^d	0,97 ^f	P
137	P11	120h	0 ^b	3 ^b	9,9 ^b	13,0 ^a	7,25 ^c	1,12 ^e	P
138	P11	144h	0 ^b	3,03 ^b	9,96 ^a	13,1 ^a	6,79 ^d	0,94 ^f	P
173	P12	48h	1,17 ^a	4,81 ^a	10,49 ^a	6,9 ^b	8,19 ^c	0,86 ^f	N
174	P12	48h	1,19 ^a	4,41 ^a	9,74 ^b	6,9 ^b	8,12 ^c	0,84 ^f	N
177	P12	48h	1,15 ^a	4,17 ^a	10,12 ^a	7,5 ^b	8,09 ^c	0,82 ^g	N
182	P12	48h	1,26 ^a	4,61 ^a	10,76 ^a	7,3 ^b	8,05 ^c	0,88 ^f	N
186	P12	48h	1,16 ^a	4,16 ^a	10,82 ^a	8,0 ^b	7,63 ^c	0,7 ^g	N
187	P12	48h	1,22 ^a	4,22 ^a	10,53 ^a	7,6 ^b	7,71 ^c	0,69 ^g	N
189	P12	48h	1,19 ^a	4,87 ^a	10,03 ^a	6,5 ^b	7,54 ^c	0,66 ^h	N
167	P13	144h	0 ^b	3,16 ^b	9,62 ^b	12,0 ^a	7,4 ^c	1,59 ^b	N
194	P14	144h	0 ^b	2,78 ^b	6,69 ^d	9,5 ^b	6,37 ^d	1,02 ^f	N
195	P14	144h	0 ^b	2,58 ^b	8,31 ^c	12,7 ^a	6,68 ^d	1,22 ^d	N
198	P14	144h	0 ^b	4,06 ^a	8,86 ^c	10,2 ^a	6,43 ^d	1,22 ^d	N

Tabela 4 – Continuação.

Código	mtDNA	Tempo (h)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	Etanol (%v/v)	Rendimento em etanol (%)	Glicerol (g/L)	Ácido Acético (g/L)	H ₂ S *
225	P15	48h	1,31 ^a	5,33 ^a	10,84 ^a	6,5 ^b	6,66 ^d	1,04 ^e	N
250	P15	96h	0,63 ^a	4,76 ^a	10,34 ^a	7,8 ^b	7,71 ^c	1,08 ^e	P
251	P15	144h	0 ^b	5,92 ^a	8,11 ^c	5,4 ^b	6,9 ^d	1,28 ^d	P
209	P15	48h	1,24 ^a	5,69 ^a	11,49 ^a	6,5 ^b	7,63 ^c	0,6 ^h	P
212	P15	48h	1,11 ^a	4,99 ^a	11,07 ^a	7,2 ^b	8,07 ^c	0,63 ^h	P
210	P16	144h	0 ^b	5,01 ^a	8,78 ^c	8,0 ^b	7,6 ^c	1,4 ^c	P
222	P16	144h	0 ^b	4,55 ^a	9,06 ^b	9,1 ^b	7,27 ^c	1,28 ^d	P
218	P17	144h	0 ^b	5,04 ^a	6,01 ^d	5,0 ^b	7,05 ^d	1,31 ^c	P
219	P17	144h	0 ^b	2,93 ^b	8,09 ^c	10,9 ^a	6,64 ^d	1,24 ^d	P
221	P17	48h	1,11 ^a	5,07 ^a	10,37 ^a	6,7 ^b	7,62 ^c	0,87 ^f	P
220	P18	144h	0 ^b	3,27 ^b	8,79 ^c	10,6 ^a	6,5 ^d	1,3 ^d	P
231	P18	144h	0 ^b	4,94 ^a	8,54 ^c	6,8 ^b	5,52 ^d	1,15 ^e	P
248	P19	144h	0 ^b	3,83 ^b	9,5 ^b	12,1 ^a	6,67 ^d	0,91 ^f	P
249	P20	144h	0 ^b	2,19 ^b	9,14 ^b	16,5 ^a	7,27 ^c	0,63 ^g	P
283	P21	144h	0 ^b	2,81 ^b	9,32 ^b	13,1 ^a	6,02 ^d	1,06 ^e	P
284	P21	144h	0 ^b	2,66 ^b	8,4 ^c	12,5 ^a	7,78 ^c	1,2 ^d	P
288	P22	48h	0 ^b	3,54 ^b	10,69 ^a	11,95 ^a	6,82 ^d	0,75 ^g	P
289	P22	48h	1,17 ^a	5,13 ^a	10,47 ^a	6,8 ^b	8 ^c	0,75 ^g	P
294	P22	48h	0 ^b	3,88 ^b	10,11 ^a	10,3 ^a	7,34 ^c	0,76 ^g	P
C1	P23	96h	0 ^b	4,48 ^a	8,68 ^c	7,6 ^b	7,82 ^c	0,77 ^g	N
C2	P24	120h	1,17 ^a	3,81 ^b	8,13 ^c	6,5 ^b	6,94 ^d	0,86 ^f	P
C3	P25	72h	1,09 ^a	4,64 ^a	9,62 ^b	6,6 ^b	7,77 ^c	0,84 ^g	P
C4	P25	96h	1,27 ^a	4,85 ^a	8,86 ^c	5,7 ^b	7,67 ^c	0,87 ^f	P
C5	P26	48h	1,2 ^a	4,07 ^a	10,43 ^a	7,8 ^b	8,67 ^b	0 ⁱ	P
C6	P27	72h	0 ^b	4,74 ^a	8,69 ^c	7,3 ^b	8,08 ^c	0,79 ^g	P

* P = produção positiva de H₂S; N = produção negativa de H₂S

As médias seguidas pela mesma letra (a, b, c, d, e, f, g, h, i) não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado ANOVA, em seguida o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Tempo = tempo de fermentação das linhagens de *S. cerevisiae* em mosto sintético.

Isolados marcados em negrito foram selecionados para as etapas posteriores do trabalho.

Para todos os isolados, o tempo de fermentação variou de 48 a 144h; a concentração de glicose nos tempos de fermentação variou de 0 a 2,63 g/L; as concentrações de frutose variaram de 2,18 a 6,55 g/L e de etanol (% v/v) de 5,76 a 11,49%. O rendimento em etanol (%) variou de 5,0% a 16,5%, e as concentrações de glicerol e de ácido acético variaram de 5,64 a 10,81 g/L e de 0 a 1,81 g/L, respectivamente. A menor concentração encontrada para o

ácido acético foi aquela obtida a partir de fermentação utilizando a linhagem comercial C5 (Tabela 4).

A concentração inicial de açúcares nas microfermentações foi de 209,75 g/L (106 g/L de glicose e 103,75 g/L de frutose), dosados por HPLC. Todos os isolados de *S. cerevisiae* estudados no presente trabalho apresentaram preferência para o consumo de glicose em relação ao consumo de frutose. O consumo de frutose pela levedura é menor na presença de altos níveis de etanol, e, por consequência, esse açúcar apresenta maiores valores residuais durante a fermentação alcoólica em relação aos valores encontrados para a glicose (BERTHELIS et al., 2004).

A frutose apresenta um dulçor aproximadamente duas vezes maior do que a glicose; com isso, a presença desse açúcar como açúcar residual tem um efeito muito mais significativo na doçura final do vinho, podendo ser o principal fator causador de doçura indesejável em vinhos secos. O alto teor de frutose residual também significa um rendimento em etanol mais baixo e um maior risco de contaminação microbiológica do vinho finalizado (LEE, 1987; BOULTON et al., 1996). Um elevado teor residual de frutose pode ser observado para 36 isolados (9, 10, 287, 19, 54, 57, 81, 82, 87, 111, 115, 122, 125, 117, 124, 144, 156, 247, 173, 174, 177, 182, 186, 187, 189, 198, 225, 250, 251, 209, 210, 222, 218, 221, 231 e 289) que não diferiram estatisticamente com concentrações de 4,05 a 6,55 g/L (Tabelas 4). Esse isolados também não diferiram estatisticamente das leveduras comerciais C1, C3, C4, C5 e C6.

O etanol é o principal bioproduto da fermentação alcoólica, e sua produção é influenciada pelo conteúdo de açúcar, temperatura de fermentação e pela linhagem de levedura utilizada. Esse álcool pode ser produzido em concentrações de 14 a 15% durante a produção do vinho, e valores acima desses são geralmente resultantes da suplementação com açúcar durante a fermentação (JACKSON, 2008). No presente estudo, os valores de etanol variaram de 5,76 a 11,49% (v/v) (Tabela 4). Os únicos valores abaixo de 7% (v/v) foram encontrados para os isolados 155 (5,76% v/v com 144h de fermentação), 218 (6,01% v/v com 144h de fermentação), 295 (6,63% v/v com 144h de fermentação) e 194 (6,69% v/v com 144h de fermentação). Deve-se ressaltar que o maior valor da produção de etanol (11,49 % v/v) foi encontrado para a levedura indígena 209 isolada da variedade de uva Petit Verdot, essa linhagem não diferiu estatisticamente de outras linhagens indígenas (10, 12, 96, 17, 95, 57, 26, 30, 87, 115, 125, 122, 138, 173, 177, 182, 186, 187, 189, 225, 250, 212, 221, 288, 124, 289 e 294) com concentrações de 9,96 a 11,07% (v/v).

O segundo bioproduto mais abundante na fermentação alcoólica é o glicerol. O glicerol desempenha um papel organoléptico muito importante no vinho por apresentar um sabor adocicado, semelhante ao da glicose, mas leve, de modo que afeta apenas a doçura em vinhos secos caso a sua concentração ultrapasse 5 g/L (JACKSON, 2008; 2009). Esse produto afeta a viscosidade do vinho somente quando sua concentração é igual ou maior que 26 g/L, concentração essa raramente obtida (NOBLE; BURSICK, 1984; JACKSON, 2008). Todos isolados de *S. cerevisiae* testados no presente trabalho produziram valores acima de 5 g/L (Tabela 4). Adicionalmente, os valores de glicerol encontrados para os isolados de *S. cerevisiae* indígenas 12, 13, 82, 87, 96, 111, 115 e 122, que não diferiram estatisticamente entre si com concentrações de 9,77 a 10,81 g/L, foram melhores que os encontrados para as linhagens comerciais (Tabela 4). Outros estudos utilizando meios sintéticos de fermentação similares ao empregado no presente estudo obtiveram concentrações de glicerol semelhantes às encontradas neste trabalho para as linhagens de *S. cerevisiae* estudadas (MARTÍNEZ-MORENO et al., 2012; ANDORRÀ et al., 2012; GUTIÉRREZ et al., 2012).

Como ocorre para a produção do glicerol, a produção de ácido acético é intimamente dependente do nível de açúcar inicial no mosto. Quanto maior o teor de açúcares no mosto, mais ácido acético e glicerol a levedura irá produzir (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). O ácido acético é produzido em pequena quantidade pelas leveduras na fermentação alcoólica, sendo produzido por *S. cerevisiae*, dependendo da linhagem, em quantidades que variam entre 0,1 e 0,3 g/L num mosto com concentração de açúcar inicial menor do que 220 g/L (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). No entanto, de acordo com Fleet e Heard (1993), linhagens de *S. cerevisiae* normalmente produzem de 0,3 a 0,8 g/L de ácido acético. Níveis de até 0,6 g/L de ácido acético em vinhos são aceitáveis (ROMANO, 1990). Acima desse valor, o vinho apresenta um gosto amargo, efeito indesejável para a qualidade do mesmo. Todos os isolados testados apresentaram valores acima de 0,6 g/L de ácido acético, com exceção da linhagem de *S. cerevisiae* comercial C5 que apresentou uma concentração não detectável pela técnica de HPLC utilizada (Tabela 4). As menores concentrações de ácido acético encontradas para as *S. cerevisiae* indígenas foram constatados para as linhagens 14, 15, 209, 144, 189 e 212 que não diferiram estatisticamente entre si com concentrações de 0,51 a 0,66 g/L (Tabela 4). A maior concentração encontrada de ácido acético foi produzida pela levedura 295, com 1,81 g/L. Valores de ácido acético elevados também foram encontrados para as *S. cerevisiae* comerciais utilizadas como controle e à título de comparação (0,77 a 0,87 g/L), exceto para a linhagem C5. Valores semelhantes (ou mesmo acima) de ácido acético também

foram encontrados em fermentações que utilizaram a mesma constituição de mosto sintético empregada no presente trabalho (MARULLO et al., 2004; 2007, GUTIÉRREZ et al., 2012). No entanto, a fermentação realizada em pequenos volumes no presente estudo pode ter influenciado na quantidade de ácido acético produzido, já que a levedura realiza a fermentação alcoólica e pode estar respirando simultaneamente. Em contrapartida, nos experimentos de produção dos vinhos (em volumes maiores), como mostrado no item 3.4.2, não foi constatada a produção de ácido acético, corroborando o que foi escrito acima. Outro fator que pode ter influenciado na produção desse ácido é a fermentação em mosto sintético, visto que nos trabalhos de Marullo e colaboradores (2004; 2007), e Gutiérrez e colaboradores (2012) também houve essa elevada produção em mosto sintético de mesma constituição.

Por meio das características analisadas (Tabela 4) em conjunto (menor tempo de fermentação, maior consumo de glicose e frutose, menor produção de etanol, menor rendimento em etanol, maior produção de glicerol e menor produção de ácido acético) foi selecionado um isolado de *S. cerevisiae* indígena de cada perfil de restrição do DNA mitocondrial, totalizando em vinte e duas linhagens. Após essa seleção, uma nova seleção foi realizada, utilizando os mesmos critérios de escolha acima, selecionando nove *S. cerevisiae* indígenas para a produção dos vinhos (em triplicatas). Os isolados escolhidos foram os de número 14, 24 e 30 (isolados do mosto fermentado da variedade de uva Syrah da Fazenda Vinibrasil), 293 e 294 (isolados do mosto fermentado da variedade de uva Cabernet Sauvignon da Fazenda Vinibrasil), 133 e 136 (isolados do mosto fermentado da variedade de uva Chenin blanc da Fazenda Ouro Verde), 248 e 249 (isolados do mosto fermentado da variedade de uva Cabernet Sauvignon da Fazenda Ducos), essas linhagens estão marcadas em negrito na tabela 2. Além dessas, as leveduras comerciais C1 (Maurivin AWRI-796) e C6 (Fermol Rouge) foram também escolhidas por serem usadas no Vale do São Francisco (VSF) na produção de vinhos tintos, sendo a C1 a mais utilizada.

3.4 Produção dos vinhos em pequena escala

3.4.1 Análise da presença dos compostos fenólicos totais nos vinhos

As concentrações dos compostos fenólicos totais nos vinhos elaborados com a variedade de uva Syrah empregando-se as nove leveduras *S. cerevisiae* indígenas selecionadas (vinho 1 ao vinho 9), duas leveduras comerciais utilizadas no Vale do São Francisco (vinho 10 e 11) estão representadas na tabela 5.

Tabela 5 – Média das concentrações dos compostos fenólicos totais encontrados nos vinhos elaborados com a variedade de uva Syrah e produzidos pelas linhagens indígenas e comerciais de *Saccharomyces cerevisiae*.

Vinhos	Concentração (mg/mL)
Vinho 1 (levedura indígena 14)	0,2450±0,01
Vinho 2 (levedura indígena 24)	0,2530±0,01
Vinho 3 (levedura indígena 30)	0,3074±0,02
Vinho 4 (levedura indígena 293)	0,2521±0,04
Vinho 5 (levedura indígena 133)	0,3189±0,03
Vinho 6 (levedura indígena 136)	0,3245±0,01
Vinho 7 (levedura indígena 248)	0,3464±0,02
Vinho 8 (levedura indígena 249)	0,2993±0,01
Vinho 9 (levedura indígena 294)	0,3431±0,02
Vinho 10 (C1 = linhagem comercial Maurivin AWRI-796)	0,3292±0,03
Vinho 11(C6 = linhagem comercial Fermol Rouge)	0,4257±0,11

Pode-se observar que os vinhos elaborados pelas *S. cerevisiae* indígenas apresentaram valores dos compostos fenólicos totais variando de 0,2450 a 0,3464 mg/mL, valores próximos ao encontrado nos vinhos elaborados pela linhagem C1 (0,3292 mg/mL), levedura comercial mais utilizada na produção dos vinhos no Vale do São Francisco. O vinho 11 (levedura comercial C6) apresentou a maior concentração dos compostos fenólicos totais dentre todos os vinhos analisados (0,4257 mg/mL). De acordo com Singleton (1982), raramente a concentração dos compostos fenólicos totais dos vinhos tintos, disponíveis comercialmente, estão acima de 2,5 g/L.

Stratil e colaboradores (2008) testaram 20 vinhos tintos de diversas origens e variedades quanto à concentração dos compostos fenólicos. Os autores observaram que o vinho feito com a variedade Syrah apresentou 1,871 mg/mL de compostos fenólicos, e o maior valor foi encontrado em um vinho tinto italiano (2,262 mg/mL). Minussi e colaboradores (2003) constataram para vinhos tintos brasileiros uma concentração média de compostos fenólicos totais de 1,920 mg/L. Lucena e colaboradores (2010) encontraram concentrações elevadas de compostos fenólicos totais em vinhos tintos do Vale do São Francisco, sendo os maiores valores constatados para as variedades Syrah e Tannat, ambas com 5,9 g GAE/L, e o menor valor encontrado foi de 3,2 g GAE/L da variedade Cabernet Sauvignon. Esses valores estão muito acima dos encontrados no presente estudo nos vinhos elaborados com as linhagens indígenas selecionadas e com as leveduras comerciais. Todas as concentrações dos compostos fenólicos encontrados nos estudos citados correspondem a

valores de uma vinificação completa, ou seja, foi realizada também a fermentação malolática, etapa aplicada após o final da fermentação alcoólica. Essa etapa não foi realizada no presente estudo, isso pode ter influenciado nos menores níveis de compostos fenólicos encontrados, assim como a pequena quantidade de uva utilizada para realizar a fermentação em 600 mL de mosto de uva (Syrah), visto que a influência majoritária é da uva na concentração dos fenólicos totais (SOLEAS et al., 1997).

3.4.2 Consumo de açúcares e produção de etanol, glicerol e ácido acético

Após a finalização da fermentação alcoólica (duração de cinco dias para todas as linhagens), foram dosados por HPLC o consumo dos açúcares (glicose e frutose), a produção de etanol, glicerol e ácido acético nos vinhos produzidos no presente trabalho. Foi dosado também por HPLC a concentração dos açúcares presentes no mosto inicial do vinho, sendo 89,6 g/L de glicose e 120,6 g/L de frutose, totalizando em 210,2 g/L de açúcar (Tabela 6).

Apenas no vinho 2 foi detectada a presença de glicose (0,6 g/L). A frutose foi detectada em todos os vinhos, com valores variando de 0,4 a 1 g/L, e estatisticamente iguais. Os resultados também sugerem que a fermentação alcoólica foi realizada com êxito por todas as leveduras, já que toda a glicose foi consumida no processo de fermentação de praticamente todos os vinhos, e a frutose encontrada em todos os vinhos foi menor que 2 g/L.

A produção de etanol nos vinhos variou de 10,4% a 12,7% (v/v), valores esses aceitos pela legislação brasileira (8,6-14%). A linhagem que produziu a menor concentração de etanol foi o isolado 293 (10,4% v/v), do vinho 4. Os vinhos 10 e 11, produzidos pelas leveduras comerciais C1 e C6, respectivamente, apresentaram teores alcoólicos estatisticamente iguais aos vinhos 1, 2, 3, 7, 8 e 9 produzidos pelas linhagens indígenas selecionadas. As concentrações de etanol dos vinhos 5 e 6 foram equivalentes à 11,1% e 11,3%, respectivamente, e estatisticamente iguais.

A produção do glicerol, como mostrado na tabela 6, variou de 8,3 a 9,6 g/L, concentrações essas consideradas adequadas (JACKSON, 2008; 2009). Esses valores estão acima de 5 g/L, concentração que afeta a doçura em vinhos secos, e são valores maiores do que aqueles verificados em outros trabalhos (ÁLVAREZ-PÉREZ et al., 2012; CADIÈRE et al., 2012; GUTIÉRREZ et al., 2012; ROSSOUW et al., 2012). Todos os vinhos nesse estudo não diferiram estatisticamente quanto a concentração de glicerol produzida pelos mesmos.

Não foi detectado pelo HPLC ácido acético em todas as amostras de vinho. Vale ressaltar que nos experimentos de fermentação em mosto sintético, utilizando-se essas

mesmas linhagens indígenas e comerciais (com exceção da linhagem comercial C5), valores elevados (acima de 0,6 g/L) para esse ácido foram encontrados (Tabela 4). Nesse sentido, demonstra que na fermentação em mosto sintético o comportamento fermentativo na produção do ácido acético foi diferente do encontrado nos vinhos, pois além de realizarem a fermentação alcoólica realizaram também a respiração, já que o ambiente não ficou totalmente em anaerobiose e com isso tornando a acidez maior. Além das linhagens indígenas selecionadas terem se comportado diferentemente quanto a produção do ácido acético no mosto sintético e no vinho, com relação ao tempo de fermentação alcoólica também foi diferente, todas terminaram essa fermentação em cinco dias (120h). Esse fato justifica também a escolha de linhagens indígenas que terminaram a fermentação no mosto sintético em 144h, pois no vinho o tempo foi menor e igual para todas. Contudo, a utilização do mosto sintético de fermentação como parâmetro para selecionar linhagens é importante porque todas estão sob as mesmas condições para serem analisadas.

De acordo com as concentrações analisadas de etanol, glicerol, ácido acético e açúcares, pode-se observar que as linhagens indígenas apresentaram resultados semelhantes às leveduras comerciais.

Tabela 6 – Média das concentrações de glicose (g/L), frutose (g/L), etanol (% v/v), glicerol (g/L) e ácido acético (g/L) encontradas nos vinhos elaborados com a variedade de uva Syrah e produzidos com as linhagens indígenas e comerciais de *Saccharomyces cerevisiae*, e do vinho produzido por fermentação espontânea.

Vinho	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	Etanol % (v/v)	Glicerol (g/L)	Ácido Acético
Mosto inicial do vinho	89,9±4,7 ^a	120,6±7,6 ^a	*ND	*ND	*ND
Vinho 1 (linhagem 14)	*ND	0,9±0,2 ^b	12,7±0,2 ^a	9,4±0,2 ^a	*ND
Vinho 2 (linhagem 24)	0,6 ±1,0 ^b	0,5±0,4 ^b	12,0±0,4 ^a	8,8±0,5 ^a	*ND
Vinho 3 (linhagem 30)	*ND	0,8±0,2 ^b	12,1±0,3 ^a	8,8±0,4 ^a	*ND
Vinho 4 (linhagem 293)	*ND	0,9±0,7 ^b	10,4±0,7 ^c	8,3±0,4 ^a	*ND
Vinho 5 (linhagem 133)	*ND	0,4±0,5 ^b	11,1±0,3 ^b	8,3±0,6 ^a	*ND
Vinho 6 (linhagem 136)	*ND	0,4±0,4 ^b	11,3±0,5 ^b	8,7±0,3 ^a	*ND
Vinho 7 (linhagem 248)	*ND	0,4±0,3 ^b	12,0±0,2 ^a	9,2±0,4 ^a	*ND
Vinho 8 (linhagem 249)	*ND	1,0±0,3 ^b	11,9±0,3 ^a	9,6±3,2 ^a	*ND
Vinho 9 (linhagem 294)	*ND	0,8±0,8 ^b	11,7±0,3 ^a	9,2±0,4 ^a	*ND
Vinho 10 (C1 = Maurivin AWRI-796)	*ND	0,8±0,2 ^b	11,8±0,1 ^a	8,8±0,4 ^a	*ND
Vinho 11 (C6 = Fermol Rouge)	*ND	0,9±0,2 ^b	11,9±0,4 ^a	8,3±0,2 ^a	*ND

Foi aplicado ANOVA, em seguida o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra (a, b, c) não diferem estatisticamente entre si.

*ND - Não Detectado.

3.4.3 Determinação dos compostos voláteis nos vinhos

Trinta e três compostos voláteis foram identificados nos vinhos produzidos com as linhagens de *S. cerevisiae* selecionadas (Tabela 7). Na tabela 8 encontram-se os respectivos Índices de retenção de Kovats calculado e encontrados na literatura dos compostos. Os grupos de compostos aromáticos que foram identificados neste trabalho corresponderam aos ésteres (17 compostos diferentes), ácidos (dois compostos diferentes) e álcoois (cinco compostos diferentes), além de outros nove compostos diferentes. Vinte e um desses compostos apareceram em 100% dos vinhos. Dois compostos (butanoato de etila; octanoato de 2-metil-butila) foram detectados em 90,9% dos vinhos; dois compostos (ciclohexano; 1,3-di-tert-butil-benzeno) em 72,7%; um composto (ácido decanóico) em 45,4%; um composto (9-decenoato de etila) em 27,3%; dois compostos (2-metóxi-2-metil-propano; 1-(1-ethoxyethoxy) pentano) em 36,4%; um composto (Succinato de dietila) em 18,2%; e três compostos (2,4,5-trimethyl-1,3-dioxolane; oleato de etila; 4-hydroxyphenethyl alcohol) em 9,1% dos vinhos (Tabela 7).

Tabela 7 – Média das concentrações dos compostos voláteis encontrados nos vinhos elaborados com a variedade de uva Syrah e produzidos com as linhagens indígenas e comerciais selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Composto (mg/L)	Vinho										
	1**	2**	3**	4**	5**	6**	7**	8**	9**	10**	11**
3-octanol (padrão interno)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Ésteres Totais (17)											
acetato de etila	32,910 ^b	35,699 ^b	30,707 ^b	35,486 ^b	25,661 ^a	22,904 ^a	24,391 ^a	29,879 ^b	24,096 ^a	31,780 ^b	33,523 ^b
butanoato de etila	0,241 ^a	0,193 ^a	0,196 ^a	0,235 ^a	0,157 ^a	0,165 ^a	0,068 ^b	*ND	0,105 ^b	0,206 ^a	0,235 ^a
acetato isoamílico	0,799 ^c	0,752 ^c	0,484 ^c	1,934 ^a	0,813 ^c	0,588 ^c	0,697 ^c	1,812 ^a	1,006 ^b	1,102 ^b	1,091 ^b
acetato de 2-metil-butil	0,074 ^c	0,070 ^c	0,043 ^c	0,232 ^a	0,085 ^c	0,060 ^c	0,075 ^c	0,195 ^b	0,103 ^c	0,089 ^c	0,090 ^c
hexanoato de etila	0,220 ^a	0,147 ^b	0,197 ^a	0,265 ^a	0,136 ^b	0,135 ^b	0,115 ^b	0,144 ^b	0,181 ^a	0,219 ^a	0,210 ^a
succinato de dietila	0,650 ^a	0,698 ^a	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND
octanoato de etila	0,377 ^b	0,312 ^c	0,452 ^b	0,570 ^a	0,279 ^c	0,265 ^c	0,133 ^d	0,170 ^d	0,285 ^c	0,345 ^b	0,396 ^b
acetato de Fenil-Etil	0,010 ^c	0,018 ^c	0,016 ^c	0,102 ^a	0,021 ^c	0,018 ^c	0,043 ^b	0,123 ^a	0,064 ^b	0,033 ^c	0,030 ^c
nonanoato de etila	0,042 ^a	0,047 ^a	0,045 ^a	0,050 ^a	0,031 ^b	0,030 ^b	0,017 ^c	0,014 ^c	0,006 ^c	0,007 ^c	0,010 ^c
9-decenoato de etila	*ND	0,005 ^b	*ND	0,016 ^a	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	0,003 ^b	*ND
decanoato de etila	0,203 ^b	0,153 ^b	0,286 ^a	0,163 ^b	0,156 ^b	0,197 ^b	0,136 ^b	0,229 ^a	0,150 ^b	0,187 ^b	0,160 ^b
octanoato de isopentila	0,010 ^b	0,010 ^b	0,013 ^b	0,027 ^a	0,014 ^b	0,009 ^b	0,005 ^b	0,010 ^b	0,009 ^b	0,010 ^b	0,009 ^b
octanoato de 2-metil-butila	0,003 ^b	0,003 ^b	0,004 ^b	0,010 ^a	0,005 ^b	0,003 ^b	*ND	0,004 ^b	0,004 ^b	0,002 ^b	0,002 ^b
dodecanoato de etila	0,040 ^a	0,035 ^a	0,042 ^a	0,030 ^a	0,035 ^a	0,032 ^a	0,033 ^a	0,041 ^a	0,046 ^a	0,044 ^a	0,041 ^a
tetradecanoato de etila	0,146 ^a	0,111 ^b	0,179 ^a	0,084 ^b	0,127 ^a	0,136 ^a	0,210 ^a	0,158 ^a	0,058 ^b	0,094 ^b	0,056 ^b
hexadecanoato de etila	0,046 ^a	0,046 ^a	0,051 ^a	0,013 ^a	0,040 ^a	0,041 ^a	0,081 ^a	0,090 ^a	0,056 ^a	0,063 ^a	0,042 ^a
oleato de etila	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	0,020	*ND	*ND	*ND

Tabela 7 – Continuação

Composto (mg/L)	Vinho										
	1**	2**	3**	4**	5**	6**	7**	8**	9**	10**	11**
Ácidos Totais (2)											
ácido octanóico	1,05 ^c	0,586 ^d	1,728 ^a	1,379 ^b	1,406 ^b	1,300 ^b	1,560 ^a	1,380 ^b	1,017 ^c	1,206 ^b	1,033 ^c
ácido decanóico	*ND	*ND	0,015 ^b	*ND	*ND	0,012 ^b	0,030 ^a	0,044 ^a	0,013 ^b	*ND	*ND
Álcoois Totais (5)											
álcool isoamílico	246,082 ^c	261,421 ^c	190,097 ^d	263,041 ^c	335,610 ^b	235,734 ^c	312,908 ^b	371,091 ^a	303,253 ^b	239,392 ^c	193,397 ^d
2-metil-1-butanol	46,094 ^c	43,963 ^c	38,861 ^c	44,039 ^c	55,146 ^b	49,746 ^c	54,410 ^b	55,432 ^b	69,777 ^a	42,723 ^c	43,103 ^c
1-hexanol	1,480 ^a	1,562 ^a	1,800 ^a	1,814 ^a	1,264 ^a	1,473 ^a	1,450 ^a	1,649 ^a	1,713 ^a	1,593 ^a	1,355 ^a
2-fenil-etanol	30,812 ^d	40,700 ^d	37,923 ^d	87,718 ^c	44,627 ^d	33,821 ^d	120,107 ^b	148,117 ^a	105,546 ^b	37,757 ^d	24,781 ^d
isobutanol	89,642 ^b	99,973 ^b	60,357 ^b	89,163 ^b	182,322 ^a	88,175 ^b	85,175 ^b	109,066 ^b	78,844 ^b	82,481 ^b	70,665 ^b

Tabela 7 – Continuação

Composto (mg/L)	Vinho										
	1**	2**	3**	4**	5**	6**	7**	8**	9**	10**	11**
Outros (9)											
ciclohexano	1,749 ^a	1,455 ^a	1,309 ^a	*ND	0,432 ^b	0,648 ^b	0,409 ^b	*ND	0,710 ^b	*ND	0,647 ^b
2,4,5-trimethyl-1,3-dioxolane	*ND	*ND	8,809 ^a	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND
1,1-dietoxietano	9,186 ^a	11,78 ^a	23,896 ^c	5,536 ^b	3,680 ^b	2,627 ^b	13,462 ^a	21,049 ^c	11,959 ^a	9,637 ^a	11,260 ^a
2-metóxi-2-metil-propano	6,576 ^a	3,820 ^a	3,292 ^a	*ND	3,430 ^a	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND
1-(1-ethoxyethoxy) pentano	*ND	*ND	8,400 ^a	*ND	*ND	*ND	3,524 ^a	9,226 ^a	3,606 ^a	*ND	*ND
delta-3-careno	0,098 ^a	0,061 ^a	0,030 ^b	0,019 ^b	0,011 ^b	0,009 ^b	0,006 ^b	0,071 ^a	0,139 ^a	0,079 ^a	0,047 ^b
1,3-di-Tert-butyl-benzeno	0,028 ^a	0,023 ^a	0,019 ^b	0,015 ^b	0,015 ^b	0,016 ^b	0,018 ^b	0,013 ^b	*ND	*ND	*ND
4-hydroxyphenethyl alcohol	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	1,038	*ND	*ND
2,4-di-tert-butylphenol	41,925 ^a	43,309 ^a	55,183 ^b	52,024 ^b	63,233 ^c	53,866 ^b	53,786 ^b	41,729 ^a	22,011 ^d	25,576 ^d	21,005 ^d

*ND...Não Detectado

** Vinho 1 (levedura indígena 14); Vinho 2 (levedura indígena 24); Vinho 3 (levedura indígena 30); Vinho 4 (levedura indígena 293); Vinho 5 (levedura indígena 133); Vinho 6 (levedura indígena 136); Vinho 7 (levedura indígena 248); Vinho 8 (levedura indígena 249); Vinho 9 (levedura indígena 294); Vinho 10 (C1 = linhagem comercial Maurivin AWRI-796), Vinho 11 (C6 = linhagem comercial Fermol Rouge). Foi aplicado ANOVA, em seguida o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra (a, b, c, d) não diferem estatisticamente entre si.

Tabela 8 – Índices de Kovats calculado e encontrados na literatura dos compostos voláteis identificados nos vinhos elaborados com a variedade de uva Syrah e produzidos com as linhagens indígenas e comerciais selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Composto voláteis	Índice de Kovats calculado (IK)	Índice de Kovats literatura (IK_lit)
3-octanol (padrão interno)	998	991
Ésteres Totais (17)		
acetato de etila	< C7	*EM
butanoato de etila	805	804
acetato isoamílico	882	876
acetato de 2-metil-butil	884	881
hexanoato de etila	1002	998
succinato de dietila	1187	1179
octanoato de etila	1201	1197
acetato de fenil-etil	1263	1258
nonanoato de etila	1297	**NE
9-decenoato de etila	1389	**NE
decanoato de etila	1397	1391
octanoato de isopentila	1449	1445
octanoato de 2-metil-butila	1452	*NE
dodecanoato de etila	1595	1595
tetradecanoato de etila	1794	1796
hexadecanoato de etila	1993	1993
oleato de etila	2167	**NE
Ácidos Totais (2)		
ácido octanóico	1194	**NE
ácido decanóico	1372	**NE
Álcoois Totais (5)		
álcool isoamilico	745	740
2-metil-1-butanol	747	732
1-hexanol	874	870
2-fenil-etanol	1113	1107
isobutanol	< C7	*EM
Outros (9)		
ciclohexano	< C7	*EM
2,4,5-trimethyl-1,3-dioxolane	729	**NE
1,1-dietoxietano	733	730
2-metóxi-2-metil-propano	< C7	*EM
1-(1-ethoxyethoxy) pentano	979	**NE
delta-3-careno	1007	1002
1,3-di-tert-butyl-benzeno	1261	**NE
4-hydroxyphenethyl alcohol	1437	1431
2,4-di-tert-butylphenol	1515	1497

*EM = Composto identificado pelo espectro de massas no NIST

**NE = Composto não encontrado na literatura e identificado pelo espectro de massas no NIST

O aroma do vinho é formado por centenas de compostos voláteis de natureza química, concentrações e origens diferente. As leveduras são responsáveis pelo aroma secundário da fermentação do vinho, que é produzido durante a fermentação alcoólica e determinado pelos compostos produzidos por parte do metabolismo das mesmas (FLEET, 2003). Os principais grupos de compostos aromáticos derivados do metabolismo das leveduras são os ácidos orgânicos, álcoois superiores, ésteres, e, em menor quantidade, aldeídos (RAPP; VERSINI, 1991). Cada grupo de compostos é importante na formação do “flavour” do vinho e sendo diferenciado, principalmente, pela concentração produzida por cada levedura durante a fermentação alcoólica. Os compostos voláteis detectados no presente trabalho nos vinho elaborados em escala de laboratório podem contribuir para o “flavour”, e as diferenças observadas podem ser relevantes na diferenciação dos mesmos por análise sensorial. Dentro do grupo dos álcoois superiores (álcoois fusel), alguns dos mais importantes são o álcool isolamílico, 2-fenil-etanol, isobutanol, 2-metil-1-butanol, 1-hexanol (HENSCHKE; JIRANEK, 1993). As concentrações dos álcoois superiores são consideradas desejáveis devem ser inferiores a 300 mg/L. Acima de 400 mg/L são considerados indesejáveis (SWIEGERS; PRETORIUS, 2005). Os valores para os álcoois superiores encontrados no trabalho apresentaram concentrações abaixo de 400 mg/L, podendo desse modo serem consideradas desejáveis.

O álcool isoamílico é o álcool superior encontrado em maior concentração nos vinhos. Esse grupo apresenta mais de dois átomos de carbono e representa a maior concentração dentre os grupos dos compostos aromáticos (AMERINE et al., 1980). Como pode-se observar na tabela 7, o vinho de número 8 elaborado pela linhagem de *S. cerevisiae* 249 foi o que apresentou a maior concentração desse composto (371,091 mg/L). Os vinhos que apresentaram as menores concentrações desse álcool foram o vinho de número 3 (190,097 mg/L) e vinho de número 11 (193,397 mg/L), no qual não diferem estatisticamente. De acordo com a literatura, o álcool isoamílico é encontrado em vinhos em concentrações que variam de 6 a 490 mg/L (FRANCIS; NEWTON, 2005; SWIEGERS et al., 2005). Portanto, os resultados encontrados no presente trabalho podem ser considerados satisfatórios, pois nenhum vinho apresentou valores acima de 490 mg/L para álcool isoamílico.

Um outro álcool superior muito importante na composição aromática do vinho é o 2-fenil-etanol que proporciona ao vinho um aroma floral de rosas (MARTÍ et al., 2003), e é encontrado em concentrações de 4 a 197 mg/L (FRANCIS; NEWTON, 2005; SWIEGERS et al., 2005). No presente trabalho, o vinho com a maior concentração desse composto foi o de

número 8 (148,117 mg/L). Outros vinhos também apresentaram concentrações elevadas de 2-fenil-etanol, como os de número 7 (120,107 mg/L) e 9 (105,546 mg/L), nesses não havendo diferença estatística. Os vinhos de número 1, 2, 3, 5, 6, 10 e 11 apresentaram as concentrações mais baixas de 2-fenil-etanol (24,781 a 44,627 mg/L), não havendo diferença estatística entre eles. Louw e colaboradores (2010) encontraram, de um modo geral, concentrações mais baixas desse composto (14,31 – 96,27 mg/L) em vinhos produzidos com a variedade de uva Syrah na África do Sul.

O composto 2-metil-1-butanol é um álcool superior que é encontrado nos vinhos nas concentrações entre 15 e 150 mg/L, sendo que valores acima de 150 mg/L não são interessantes na bebida (FRANCIS; NEWTON, 2005; SWIEGERS et al., 2005). O vinho que apresentou a maior concentração desse composto foi o de número 9 (69,777 mg/L), e os vinhos que apresentaram as menores concentrações foram de número 1, 2, 3, 4, 6, 10 e 11 (38,861 a 49,746 mg/L), não havendo diferença estatística entre eles. Portanto, todos os valores encontrados no presente trabalho estavam abaixo do limite máximo para este composto.

O isobutanol apresenta um aroma alcoólico e é encontrado em vinhos na faixa de 9 a 174 mg/L (FRANCIS; NEWTON, 2005; SWIEGERS et al., 2005). Os vinhos que apresentaram os maiores valores desse composto foram os de números 5 (182,322 mg/L) e 8 (109,066 mg/L). Embora o vinho 8 tenha apresentado uma concentração elevada, ele não diferiu estatisticamente dos demais outros vinhos (60,357 a 99,972 mg/L). Com exceção do vinho de número 5, todos os demais apresentaram valores para esse composto semelhante àqueles obtidos em outros trabalhos (FRANCIS; NEWTON, 2005; SWIEGERS et al., 2005). O composto 1-hexanol é um álcool superior com aroma de grama (SWIEGERS; PRETORIUS, 2005; GARCIA et al., 2011), que é encontrado na faixa de 0,3 a 12 mg/L nos vinhos. Todos os vinhos no presente trabalho não apresentaram diferenças estatísticas significativas (1,264 a 1,800 mg/L) e os valores das concentrações para esse composto podem ser considerados baixos.

Os ésteres são compostos aromáticos responsáveis pelos aromas frutados e florais dos vinhos, produzidos em sua grande maioria pelas leveduras durante a fermentação alcoólica, sendo os álcoois superiores os seus precursores (FUGELSANG; EDWARDS, 2007; CARRASCOSA et al., 2011). Dentre os ésteres mais importantes na composição aromática dos vinhos estão o acetato de etila, acetato isoamílico, acetato fenil-etil, decanoato de etila, octanoato de etila e hexanoato de etila (caprato de etila), dentre outros (KÖNIG et al., 2009).

O acetato de etila é um éster encontrado em concentrações de 26 a 180 mg/L em vinhos (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000). Esse composto apresenta um aroma agradável frutado em concentrações abaixo de 150 mg/L e em concentrações mais elevadas um aroma azedo-vinagre, indesejável (GIL et al., 2006; TAO; LI, 2009; CADIÈRE et al., 2012). Os vinhos que apresentaram as maiores concentrações de acetato de etila foram os de número 1, 2, 3, 4, 8, 10 e 11 (29,879 a 35,699 mg/L), não havendo diferença estatística entre esses, sendo as menores concentrações encontrada nos vinhos de número 5, 6, 7 e 9 (22,904 a 25,661 mg/L), não havendo diferença estatística entre esses. Todos os vinhos estão dentro da faixa considerada aceitável para esse éster possuir um aroma frutado.

O acetato isoamílico é um éster muito importante, e fornece aos vinhos um aroma frutado, característico de banana, sendo encontrado na faixa de 0,1 a 3,4 mg/L (FRANCIS; NEWTON, 2005; SWIEGERS et al., 2005; GÜRBÜZ et al., 2006; AZNAR; ARROTO, 2007; GOMEZ-MIGUEZ et al., 2007). Os vinhos que apresentaram as maiores concentrações foram o vinho 4 (1,934 mg/L) e o vinho 8 (1,812 mg/L), não havendo diferença estatística entre esses, e as menores concentrações apresentaram nos vinhos de número 1, 2, 3, 5, 6 e 7 (0,484 a 0,813 mg/L), não havendo diferença estatística.

O octanoato de etila apresenta um aroma frutado, doce, de abacaxi, pêra e fruta verde, sendo encontrado em baixas concentrações em vinhos (de 0,05 a 3,8 mg/L) (FRANCIS; NEWTON, 2005; SWIEGERS et al., 2005). Os vinhos que apresentaram as maiores concentrações foram os de número 3 (0,452 mg/L) e 8 (0,229 mg/L). Os menores valores foram encontrados no vinho 7 (0,133 mg/L) e 8 (0,170 mg/L), não havendo diferença estatística entre eles. Todos os vinhos apresentaram uma faixa aceitável para esse composto. O composto decanoato de etila possui um aroma de uva, floral (AZNAR; ARROTO, 2007), e é encontrado na faixa de 0 a 2,1 mg/L (FRANCIS; NEWTON, 2005; SWIEGERS et al., 2005), sendo produzido, portanto, em baixas concentrações. Os vinhos que apresentaram as maiores concentrações foram os de número 3 (0,286 mg/L) e 8 (0,229 mg/L), sendo estatisticamente iguais, e todos os demais vinhos apresentam as menores concentrações (0,136 a 0,203 mg/L), não havendo diferença estatística significativa.

O acetato de fenil-etil confere aos vinhos um aroma floral, doce, e de rosas (AZNAR; ARROTO, 2007). É constatado em vinhos na faixa de 0 a 18,5 mg/L (FRANCIS; NEWTON, 2005; SWIEGERS et al., 2005). Os vinhos que apresentaram as maiores concentrações desse composto foram os de número 8 (0,123 mg/L) e 4 (0,102 mg/L), não havendo diferença

estatística entre eles, e os vinhos que apresentaram as menores concentrações foram os de número 1, 2, 3, 5, 6, 10 e 11 (0,010 a 0,033 mg/L), não havendo diferença estatística.

O hexanoato de etila (caprato de etila) é um éster que apresenta um aroma frutado, floral e de maçã (AZNAR; ARROTO, 2007; GOMEZ-MIGUEZ et al., 2007). Esse composto é encontrado em pequenas concentrações na faixa de 0,03 a 3,4 mg/L (FRANCIS; NEWTON, 2005; SWIEGERS et al., 2005). Os vinhos que apresentaram as maiores concentrações desse composto foram os de número 1, 3, 4, 9, 10 e 11 (0,181 a 0,265 mg/L), não havendo diferença estatística entre esses, e as menores concentrações os de número 2, 5, 6, 7 e 8 (0,115 a 0,147 mg/L), não havendo diferença estatística.

Os ácidos conferem uma característica negativa aos vinhos quando detectados em elevadas concentrações, assim como podem também inibir também a fermentação (CLARKE; BAKKER, 2004). O ácido octanóico apresenta um aroma de ranço, queijo e ácido graxo (CULLERE et al., 2004; LI, et al., 2008). Concentrações desse ácido devem ser encontradas em vinhos até 41 mg/L (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000). Os vinhos que apresentaram as maiores concentrações foram os de número 3 (1,728 mg/L) e 7 (1,560 mg/L), estatisticamente iguais, e a menor concentração o vinho de número 2 (0,586 mg/L). Portanto, todos os vinhos apresentaram valores muito baixos para esse composto.

O ácido decanóico apresenta um aroma desagradável, de gordura (LI, et al., 2008), podendo ocorrer em vinhos como em concentrações de até 54 mg/L (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000). Todos os vinhos apresentaram baixas concentrações desse composto, sendo as maiores para o de número 7 (0,030 mg/L) e 8 (0,044 mg/L), iguais estatisticamente, e as menores nos vinhos de número 3, 6 e 9 (0,012 a 0,013 mg/L), iguais estatisticamente. Esse composto não foi detectado nos vinhos de número 1, 2, 4, 5, 10 e 11.

A palavra qualidade é bastante utilizada em referência ao vinho, sendo que a Organização Internacional de Normalização define a qualidade como o "grau em que um conjunto de características inerentes satisfaz requisitos" (FRANCIS et al., 2005). Nesse sentido, o comprador irá observar todos os requisitos associados a essa palavra e comparar com outros produtos (SWIEGERS et al., 2005). Os resultados do presente trabalho sugerem que as linhagens indígenas de *S. cerevisiae* conseguiram produzir vinhos de qualidade quando o padrão utilizado para esta análise foram os compostos voláteis produzidos, comparado-se com as linhagens comerciais testadas. A linhagem indígena 249 que foi inoculada no vinho 8 apresentou-se como a linhagem que mais se destacou quanto a produção de compostos frutados e florais, sugerindo assim ser uma linhagem com características interessantes para

esses compostos que possa ser testada na produção de vinhos em escala industrial. Esses resultados são promissores na busca por linhagens indígenas regionais que possam trazer tipicidade aos vinhos do Vale do Rio São Francisco, já que os produtores locais utilizam linhagens comerciais estrangeiras. A obtenção de linhagens próprias da região capazes de produzir vinhos de qualidade poderá representar um ganho tecnológico para os produtores e agregar um maior valor comercial a esta bebida, uma vez que se estará utilizando uma linhagem de *S. cerevisiae* encontrada tipicamente da região.

4. CONCLUSÕES

- Os mostos fermentados das cinco variedades de uva (*Vitis vinifera* L.) colhidas em quatro fazendas no Vale do São Francisco foram substratos apropriados para o isolamento de linhagens indígenas de *S. cerevisiae*. Essas linhagens indígenas colonizam as uvas, e foram encontradas em maior número do que linhagens comerciais utilizadas nos processos de vinificação da região, linhagens essas também isoladas a partir das uvas estudadas;
- A análise dos perfis de restrição do DNA mitocondrial (RFLP-mtDNA) dos 259 isolados de *S. cerevisiae* obtidos mostrou a ocorrência de 22 perfis diferentes nas linhagens indígenas de *S. cerevisiae*, e dois perfis correspondentes a linhagens comerciais utilizadas na região indígenas. Foi possível detectar, portanto, a presença de linhagens comerciais introduzidas nos vinhedos da região do Vale do São Francisco. Por meio dessa técnica foi possível diferenciar as linhagens indígenas das comerciais utilizadas na região;
- Duas leveduras comerciais utilizadas na produção de vinhos na região apresentaram o mesmo perfil de restrição do DNA mitocondrial, podendo representar a mesma linhagem de *S. cerevisiae*, apesar de serem comercializadas com denominações diferentes, a partir de diferentes fabricantes;
- Os experimentos de microfermentações em meio sintético possibilitaram a seleção de nove linhagens indígenas de *S. cerevisiae* para a produção de vinhos em pequena escala. Essas linhagens apresentaram parâmetros fermentativos interessantes para a utilização como iniciadoras do processo fermentativo para a elaboração de vinhos;
- Os vinhos produzidos pelas nove linhagens indígenas de *S. cerevisiae* (vinho 1 ao vinho 9), quando comparados com os dois vinhos produzidos por linhagens comerciais de *S. cerevisiae* (vinho 10 e 11) apresentaram resultados semelhantes em relação aos teores de açúcares residuais, e concentrações de etanol, glicerol e ácido acético. Portanto, a partir da análise desses resultados, as linhagens indígenas

utilizadas na elaboração destes vinhos podem apresentar potencial para serem selecionadas como iniciadoras do processo fermentativo;

- Os vinhos produzidos pelas leveduras selecionadas apresentaram valores de compostos fenólicos muito abaixo daqueles encontrados na literatura. Uma explicação para esse resultado pode estar relacionada ao fato dos vinhos terem sido elaborados em volumes pequenos, apresentando uma menor superfície de contato com a casca, e sem a ocorrência da fermentação malolática, o que possivelmente contribuiu para uma menor concentração desses compostos nos vinhos obtidos;
- Os vinhos produzidos com as linhagens indígenas de *S. cerevisiae* apresentaram compostos voláteis semelhantes àqueles produzidos pelas linhagens comerciais. Vale destacar que compostos aromáticos frutados e florais foram detectados em elevada concentração no vinho 8. Além disso, o composto volátil 2-fenil-etanol (aroma floral e de rosas) foi detectado em concentração elevada nos vinhos 8, 7 e 9, muito acima das concentrações encontradas nos vinhos elaborados com as leveduras comerciais (vinho 10 e 11). Esses resultados sugerem que essas linhagens de leveduras indígenas, principalmente aquela utilizada para elaborar o vinho 8, apresentam potencial, após o desenvolvimento de mais estudos, para serem utilizadas na produção de vinhos do Vale do São Francisco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEB Group, 2015. Disponível em: <<http://www.aeb-group.com>> Acessado em: 11 junho 2015.

AEB USA, 2015. Disponível em: <<http://aebusa.myshopify.com>> Acessado em: 11 junho 2015.

Alpendurata, M. F., 2000. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 889, 3-14.

Álvarez-Pérez, J. M., Campo, E., San-Juan, F., Coque, J. J. R., Ferreira, V., Hernández-Orte, P., 2012. Sensory and chemical characterisation of the aroma of Prieto Picudo rosé wines: The differential role of autochthonous yeast strains on aroma profiles. *Food Chemistry*, 133, 284–292.

Amerine, A. M., Berg, H. V., Kunkee, R. E., Ough, C. S., Singleton, V. L., Webb, A. D., 1980. *The technology of winemaking* (4th ed.). Wesport, CT: AVI Technical Books Inc.

Andorrà, I., Berradre, M., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J. M., 2012. Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. *LWT- Food Science and Technology*, 49, 8-13.

Antalick, G., Perello, M. C., De Revel, G., 2010. Development, validation and application of a specific method for the quantitative determination of wine esters by headspace-solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 121, 1236–1245.

Araújo, A. J. de B., Diniz, B. C. R., Martins, A. M., Triches, W. dos S., Oliveira, V. de S., Alves, L. A., Pereira, G. E., 2009. Avaliação da influência de diferentes safras nas características físico-químicas de vinhos tintos elaborados no Submédio do Vale do São Francisco. *In: Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semi-Árido*, 4, 2009, Petrolina. Anais - Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2009, 249-253.

Araújo, A. J. B., Vanderlinde, R., Oliveira, J. de B., Silva, G. G., Biasoto, A. T., Pereira, G. E., 2012. Aromatic stability of Syrah and Petit Verdot tropical wines from Brazil. *In: IX International Terroir Congress*, 2012, Dijon/ Reims- França. IX International Terroir Congress, 2012.

- Aznar, M., Arroyo, T., 2007. Analysis of wine volatile profile by purge-and-trap-gas chromatography-mass spectrometry. Application to the analysis of red and white wines from different Spanish regions. *Journal of Chromatography A*, 1165, 151–157.
- Bakalinsky, A. T., Snow, R., 1990. The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 6, 367–382.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2012. The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 243–259.
- 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.
- Barros Lopes, M.; Soden, A.; Henschke, P. A.; Langridge, P., 1996. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4514–4520.
- Barre, P., Vézinhét, F., Dequin, S., Blondin, B., 1992. Genetic improvement of wine yeast. In: Fleet, H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 265–287.
- Bell, S. J., Henschke, P. A., 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 242–295.
- Beloqui, A. A., 1998. Contribution a l'étude des composés soufrés volatiles des vins rouges, Ph.D. thesis, University of Bordeaux II, Bordeaux, France.
- Bely, M., Sablayroles, J. M., Barre, P., 1990. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 70, 246–252.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., Dubourdieu, D., 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*–*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 312–320.
- Berthels, N. J., Cordero Otero, R. R., Bauer, F. F., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S., 2004. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*, 4, 683–689.

Bezerra-Bussoli, C., Baffi, M. A., Gomes, E., Da-Silva, R., 2013. Yeast Diversity Isolated from Grape Musts During Spontaneous Fermentation from a Brazilian Winery. *Current Microbiology*, 67, 356–361.

Bisson, L. F., 1991. Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes. In: Davis, C. A., Rantz, J. M. (Ed.), Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, pp78-89.

Bonino, M., Schellino, R., Rizzi, C., Aigotti, R., Delfini, C., Baiocchi, C., 2003. Aroma compounds of an Italian wine (Ruché) by HS–SPME analysis coupled with GC–ITMS. *Food Chemistry*, 80, 125–133.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 229 de 25 de outubro de 1988. Normas referentes à complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho e dos derivados da uva e do vinho. Diário Oficial da União, Brasília, 31 out. 1988.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 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.

Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E., 1996. Yeast and biochemistry of ethanol fermentation. In: Principles and Practices of Winemaking, pp. 102–192. Chapman & Hall, London.

Bourret, T. B., Grove, G. G., Vandemark, G. J., Henick-Kling, T., Glawe, D. A., 2013. Diversity and molecular determination of wild yeasts in a central Washington State vineyard. *North American Fungi*, 8 (15), 1-32.

Cadière, A., Aguera, E., Caillé, S., Ortiz-Julien, A., Dequin, S., 2012. Pilot-scale evaluation the enological traits of a novel, aromatic wine yeast strain obtained by adaptive evolution. *Food Microbiology*, 32, 332-337.

Caliari, V., Panceri, C. P., Rosier, J. P., Bordignon-Luiz, M. T., 2015. Effect of the Traditional, Charmat and Asti method production on the volatile composition of Moscato Giallo sparkling wines. *LWT - Food Science and Technology*, 61, 393-400.

Canuto, K. M., Pereira, G. E.; Magalhães, H. C. R, Castro, L. B; Rodrigues, T. H. S. Perfil dos compostos voláteis de vinhos brancos produzidos no Vale do São Francisco. *In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 34, 2011, Florianópolis-SC. Resumo. Florianópolis: SBQ, 2011.

Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., Pietrafesa, R., Massari, C., Poeta, C., Romano, P., 2010. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 187–192.

Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., Romano, P., 2012. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated to spontaneously fermenting grapes from an Italian “heroic vine-growing area”. *Food Microbiology*, 31, 159-166.

Capece, A., Siesto, G., Poeta, C., Pietrafesa, R., Romano, P., 2013a. Indigenous yeast population from Georgian aged wines produced by traditional “Kakhetian” method. *Food Microbiology*, 36, 447-455.

Capece, A., Siesto, G., Romaniello, R., Lagreca, V. M., Pietrafesa, R., Calabretti, A., Romano, P., 2013b. Assessment of competition in wine fermentation among wild *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Sangiovese grapes in Tuscany region. *LWT - Food Science and Technology*, 54, 485-492.

Carlile, M. J., Watkinson, S. C., Gooday, G. W. 2001. Fungal Diversity. In: Carlile, M. J., Watkinson, S. C., Gooday, G. W., *The Fungi* (2nd ed.), London, UK: Academic Press, pp. 11-84.

Carrasco, P., Querol. A., Del Olmo, M., 2001. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Archives of Microbiology*, 175, 450-457.

Carrascosa, A. V., Muñoz, R., González, R., 2011. *Molecular wine microbiology*. New York: Academia Press.

Chaves, M. M., Zarrouk, O., Francisco, R., Costa, J. M., Santos, T., Regalado, A. P., Rodrigues, M. L., 2010. Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. *Annals of Botany*, 105, 661-176.

Clarke, R. J., Bakker, J., 2004. Wine flavour chemistry. Blackwell Publishing: Oxford, 318p.

Clavijo, A., Calderón, I. L., Paneque, P., 2010. Diversity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the Serranía de Ronda (Spain) vine-growing region. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 241–245.

Clemente-Jimenez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Heras-Vázquez, F. J. L., Rodríguez-Vico, F., 2004. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology*, 21, 149–155.

Codón, A. C., Benítez, T., 1995. Variability of the physiological features and of the nuclear and mitochondrial genomes of Baker's Yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*, 18, 343 – 352.

Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., Martinez, C., 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 237–243.

Comi, G., Maifreni, M., Manzano, M., Lagazio, C., Cocolin, L., 2000. Mitochondrial DNA restriction enzyme analysis and evaluation of the enological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from grapes of the wine-producing area of Collio (Italy). *International Journal of Food Microbiology*, 58, 117–121.

Constantí, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A., Guillamón, J. M., 1997. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 339–344.

Constantí, M., Reguant, C., Poblet, M., Zamora, F., Mas, A., Guillamón, J. M., 1998. Molecular analysis of yeast population dynamics: Effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 169–175.

Cullere, L., Escudero, A., Cacho, J., Ferreira, V., 2004. Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1653-1660.

Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C., Piskur, J., 2014. Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Research*, 14, 826–832.

De Deken, R. H., 1966. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Journal of General Microbiology*, 44, 149–156.

De Oliveira, L. C., de Souza, S. O., Mamede, M. E. de O., 2011. Avaliação das características físico-químicas e colorimétricas de vinhos finos de duas principais regiões vinícolas do Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 70 (2), 158-67.

Di Maro, E., Ercolini, D., Coppola, S., 2007. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 201–210.

EnolTech, 2015. Disponível em: <<http://www.enoltech.com.au>> Acessado em: 11 junho 2015.

Erten, H., 2002. Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 373–378.

Espindola, M. C. B., Coêlho, S. C. S. de S., Dos Santos, D. F., Dourado, K. C., Alves, E. F., Lima, R. B., Alves, L. A., Lima, L. L. de A., Lima, M. V. D. de O., Althoff, T. D., Pereira, G. E., 2008. Análises físico-químicas de vinhos experimentais elaborados no Vale do Submédio São Francisco. XII Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia – Anais, pp.162. In: Anais/ XII Congresso Brasileiro de Vitivinicultura e Enologia, Bento Gonçalves, Ed. Patrícia Ritschel, Sandra de Souza Sebben. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. 185 p.

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 Microbiology*, 17, 553-562.

Esteve-Zarzoso, B., Hierro, N., Mas, A., Guillamón, J. M., 2010. A new simplified AFLP method for wine yeast strain typing. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 1480-1484.

Fell, J. W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., Statzell-Tallman, A., 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2

domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 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. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 1–10.

Fleet, G. H., Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon, P., 1984. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 48, 1034-1038.

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., 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 11–22.

Fleet, G. H., 2007. Wine. In: Doyle, M. P., Beuchat, L. R. (Eds.). *Food microbiology: Fundamentals and frontiers* (3rd ed.), pp. 863-890, Washington, DC: ASM Press.

Fleet, G. H., 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, 8, 979-995.

Francis, I. L., Newton, J. L., 2005. Determining wine aroma from compositional data. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 114–126.

Francis, I. L., Høj, P. B., Dambergs, R. G., Gishen, M., de Barros Lopes, M. A., Pretorius, I. S., Godden, P. W., Henschke, P. A., Herderich, M. J., Waters, E. J., 2005. Objective measures of grape quality – are they achievable? In: *Proceedings of the Twelfth Australian Wine Industry Technical Conference*, Melbourne, Australia (Australian Wine Industry Technical Conference Inc.: Adelaide, SA) pp. 85–89.

Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., Teissedre, P. L., 1995. Principal phenolic phytochemicals in select California Wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 890-894.

Fugelsang, K. C., Edwards, C. G., 2007. *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*. 2a ed. New York: Springer.

Garcia, C. V., Quek, S.-Y., Stevenson, R. J., Winz, R. A., 2011. Characterization of the Bound Volatile Extract from Baby Kiwi (*Actinidia arguta*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (15), 8358–8365.

Gil, M., Cabellos, J. M., Arroyo, T., Prodanov, M., 2006. Characterization of the volatile fraction of young wines from the Denomination of Origin “Vinos de Madrid” (Spain). *Analytica Chimica Acta*, 563, 145–153.

Garde-Cerdán, T., Ancín-Azpilicueta, C., 2006. Contribution of wild yeasts to the formation of volatile compounds in inoculated wine fermentations. *European Food Research and Technology*, 222, 15-25.

Gomez-Miguez, M. J., Cacho, J. F., Ferreira, V., Vicario, I. M., Heredia, F. J., 2007. Volatile components of Zalema white wines. *Food Chemistry*, 100, 1464–1473.

Grondin, E., Sing, A. S. C., Caro, Y., Raherimandimby, M., Randrianierenana, A. L., James, S., Nueno-Palop, C., François, J. M., Petit, T., 2015. A comparative study on the potential of epiphytic yeasts isolated from tropical fruits to produce flavoring compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 203, 101–108.

Guidici, P., Kunkee, R. E., 1994. The effect of nitrogen deficiency and sulphur-containing amino acids on the reduction of sulphate to hydrogen sulphide by wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 107-112.

Guillamón, J. M., Barrio, E., Huerta, T., Querol, A., 1994. Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 708-714.

Guillamón, J. M., Barrio, E., Querol, A., 1996. Characterization of Wine Yeast Strains of the *Saccharomyces* Genus on the Basis of Molecular Markers: Relationships Between Genetic Distance and Geographic or Ecological Origin. *Systematic and Applied Microbiology*, 19, 122-132.

Gupta, S., Padole, R., Variyar, P. S., Sharma, A., 2015. Influence of radiation processing of grapes on wine quality. *Radiation Physics and Chemistry*, 111, 46–56.

Gürbüz, O., Rouseff, J. M., Rouseff, R. L., 2006. Comparison of aroma volatiles in

commercial Merlot and Cabernet Sauvignon wines using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (11), 3990-3996.

Gutiérrez, A., Chiva, R., Sancho, M., Beltran, G., Arroyo-López, F. N., Guillamon, J. M., 2012. Nitrogen requirements of commercial wine yeast strains during fermentation of a synthetic grape must. *Food Microbiology*, 31, 25-32.

Henschke, P. A., Jiranek, V., 1993. Metabolism of nitrogen compounds. In: Fleet, G. H. (Ed.), *Wine microbiology and biotechnology*, 77-164. Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers.

Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., Sebastiani, L., 2008. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro, antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 589–598.

Ishige, K., Schubert, D., Sagara, Y., 2001. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biology & Medicine*, 30, 433-446.

Jackson, R. S. *Wine Science: Principles and Applications*. Academic Press, 3a ed., San Diego, CA, 776p. 2008.

Jackson, R. S. *Wine Tasting*. Academic Press, 2a ed., San Diego, CA, 512p., 2009.

James, S. A., Stratford, M., 2011. *Zygosaccharomyces* Barker (1901). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., eds. *The Yeasts, A Taxonomic Study* 5th Edn. Elsevier, Amsterdam pp.937-948.

Jiranek, V., Langridge, P., Henschke, P. A., 1995a. Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 461–467.

Jiranek, V., Langridge, P., Henschke, P.A., 1995b. Validation of bismuth- containing indicator media for predicting H₂S-producing potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast under enological conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 269–273.

Kataoka, H.; Lord, H.; Pawliszyn, J., 2000. Applications of solid-phase microextraction in

food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880, 36-62.

Katsube, N., Keiko, I., Tsushida, T., Yamaki, K., Kobori, M., 2003. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51, 68-75.

König, H., Uden, G., Fröhlich, J., 2009. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 513pp.

Kurtzman, C.P., 2011a. *Meyerozyma* Kurtzman & M. Suzuki (2010). In: Kurtzman, C.P., Fell, J. W., Boekhout, T., eds. *The Yeasts, A Taxonomic Study* 5th. ed. Elsevier, Amsterdam pp.621-628.

Kurtzman, C. P., 2011b. *Torulaspora* Lindner (1904). In: Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., eds. *The Yeasts, A Taxonomic Study* 5th. ed. Elsevier, Amsterdam pp.867-874.

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 C. A. & Péter G. (eds). Springer-Verlag, Heidelberg, p. 11-30.

Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., 2011. *The Yeasts, A Taxonomic Study* 5th. ed. Elsevier, Amsterdam, 2354pp.

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.

Kurtzman, C. P., Robnett, C. J., 2013. Relationships among genera of the *Saccharomycotina* (*Ascomycota*) from multigene phylogenetic analysis of type species. *FEMS Yeast Research*, 13 (1), 23-33.

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 Research*, 4, 253–258.

Lambrechts, M. G., Pretorius, I.S., 2000. Yeast and its importance to wine aroma - A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21, 97–129.

Landaud, S., Helinck, S., Bonnarme, P., 2008. Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 1191–1205.

Lapidot, T., Harel, S., Akiri, B., Granit, R., Kanner, J., 1999. pH-Dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 67-70.

Lee, C. K., 1987. The chemistry and biochemistry of the sweetness of sugars. *Adv. Carbohydr. ChemBiochem*, 45, 199-351.

Leighton F., Urquiaga I., 2000. Los componentes del vino y sus efectos beneficiosos para la salud humana, VII Congreso latinoamericano de viticultura y enología, Mendoza, Argentina.

Li, S-S., Cheng, C., Li, Z., Chen, J-Y., Yan, B., Han, B-Z., Reeves, M., 2010. Yeast species associated with wine grapes in China. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 85–90.

Liang, H-Y., Chen, J-Y., Reeves, M., Han, B-Z., 2013. Aromatic and sensorial profiles of young Cabernet Sauvignon wines fermented by different Chinese autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Research International*, 51, 855–865.

Linderholm, A., Dietzel, K., Hirst, M., Bisson, L. F., 2010. Identification of met10-932 and characterization as an allele reducing hydrogen sulfide formation in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 23, 7699-7707.

Lucena, A. P. S., Nascimento, R. J. B., Maciel, J. A. C., Tavares, J. X., Barbosa-Filho, J.M., Oliveira, E. J., 2010. Antioxidant activity and phenolics content of selected Brazilian wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 30–36.

Mamede, M. E. O., Pastore, G. M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. *Boletim CEPPA, Curitiba*, v. 22, p. 233-252, 2004.

Maqueda, M., Zamora, E., Nieves Rodríguez-Cousiño, N., Ramírez, M., 2010. Wine yeast molecular typing using a simplified method for simultaneously extracting mtDNA, nuclear DNA and virus dsRNA. *Food Microbiology*, 27, 205–209.

Martí, M. P., Mestres, M., Sala, C., Busto, O., Guasch, J., 2003. Solid-phase microextraction and gas chromatography olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the aroma extract dilution analysis applied to the characterization of wine aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (27), 7861–7865.

Martínez-Moreno, R., Morales, P., Gonzalez, R., Mas, A., Beltran, G., 2012. Biomass production and alcoholic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of nitrogen source. *FEMS Yeast Research*, 12, 477–485.

Martini, A., Ciani, M., Scorzzetti, G., 1996. Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, 435–440.

Marullo, P., Bely, M., Masneuf-Pomarede, I., Aigle, M., Dubourdieu, D., 2004. Inheritable nature of enological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*, 4, 711–719.

Marullo, P., Aigle, M., Bely, M., Masneuf-Pomarède, I., Durrens, P., Dubourdieu, D., Yvert, G., 2007. Single QTL mapping and nucleotide-level resolution of a physiologic trait in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Yeast Research*, 7, 941–952.

Mauriello, G., Capece, A., D'Auria, M., Garde-Cerdán, T., Romano, P., 2009. SPME–GC method as a tool to differentiate VOC profiles in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Food Microbiology*, 26, 246–252.

Maurivin, 2015. Disponível em: <<http://www.maurivin.com>> Acessado em: 11 junho 2015.

Mendes-Ferreira, A., Barbosa, C., Falco, V., Leao, C., Mendes-Faia, A., 2009. The production of hydrogen sulphide and other aroma compounds by wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* in synthetic media with different nitrogen concentrations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36 (4), 571–583.

Mercado, L., Dalcero, A., Masuella, R., Combina, M., 2007. Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiology*, 24, 403–412.

Mercado, L., Sturm, M. E., Rojo, M. C., Ciklic, I., Martínez, C., Combina, M., 2011.

Biodiversity of *Saccharomyces cerevisiae* populations in Malbec vineyards from the “Zona Alta del Río Mendoza” region in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 319–326.

Mestres, M., Marti, M. P., Busto, O., Guasch, J., 2000. Analysis of low-volatility organic sulphur compounds in wines by solid-phase microextraction and gas chromatography, *Journal of Chromatography A*, 881, 583–590.

Miele, A., Rizzon, L. A, Zanús, M. C., (2010). Discrimination of Brazilian red wines according to the viticultural region, varietal, and winery origin. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30 (1), 268-75.

Miller, G. L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.

Mills, D. A., Johannsen, E. A., Cocolin, L., 2002. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4884–4893.

Minussi, R. C, Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G. M., Duran, N., 2003. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry*, 82, 409-416.

Moreira, N., Mendes, F., Pereira, O., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., Vasconcelos, I., 2002. Volatile sulphur compounds in wines related to yeast metabolism and nitrogen composition of grape musts. *Analytica Chimica Acta*, 458, 157–167.

Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., Vasconcelos, I., 2008. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 231-238.

Mortimer, R., Polsinelli, M., 1999. On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology*, 150, 199–204.

Naumov, G. I., 1996. Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Journal of Industrial Microbiology*, 17, 295–302.

Nikolaou, E., Andrighetto, C., Lombardi, A., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., 2007.

Heterogeneity in genetic and phenotypic characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from red and white wine fermentations. *Food Control*, 18, 1458–1465.

NIST. <<http://webbook.nist.gov/chemistry/>> Acessado: 11 junho 2015.

Noble, A. C., and Bursick, G. F., 1984. The contribution of glycerol to perceived viscosity and sweetness in white wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 35, 110–112.

Nykänen, L., 1986. Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 84–96.

Oliveira, V. S., Lima, A. M. N., Salviano, A. M., Bassoi, L. H., Pereira, G. E., 2015. Heavy metals and micronutrients in the soil and grapevine under different irrigation strategies. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, 39, 162-173.

Ortiz, M. J., Barrajón, N., Baffi, M. A., Arévalo-Villena, M., Briones, A., 2013. Spontaneous must fermentation: Identification and biotechnological properties of wine yeasts. *LWT - Food Science and Technology*, 50, 371-377.

Pereira, G. E., Araújo, A. J. B., Santos, J., Vanderlinde, R., Lima, L. L. A., 2011. Chemical and aromatic characteristics of Brazilian tropical wines. *Acta Horticulturae*, n. 910, 135-140.

Pérez-Martín, F., Seseña, S., Fernández-González, M., Arévalo, M., Llanos Palop, M. L., 2014. Microbial communities in air and wine of a winery at two consecutive vintages. *International Journal of Food Microbiology*, 190, 44–53.

Perrone, B., Giacosa, S., Rolle, L., Cocolin, L., Rantsiou, K., 2013. Investigation of the dominance behavior of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 165, 156–162.

Pietta, P. G., 2000. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63 (7), 1035 – 1042.

Ponzzes-Gomes, C. M. P B. S., Mélo, D. L. F. M., Santana, C. A., Pereira, G. E., Mendonça, M. O. C., Gomes, F. C. O., Oliveira, E. S., Barbosa Jr, A. M., Trindade, R. C., Rosa, C. R., 2014. *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts in grape varieties of the São Francisco Valley. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45 (2), 411-416.

Presque Isle Wine Cellars, 2015. Disponível em: <<http://www.piwine.com>> Acessado em: 11 junho 2015.

Pretorius, I. S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millenium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675-729.

Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramón, D., 1992a. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeasts strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2948-2953.

Querol, A., Barrio, E., Ramón, D., 1992b. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 15, 439-446.

Querol, A., Barrio, E., Ramón, D., 1994. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 21, 315-323.

Rapp, A., Mandery, H., 1986. Wine aroma. *Experientia*, 42, 873-884.

Rapp, A., Pretorius, P. J., Kugler, D., 1992. Foreign and undesirable flavours in wine. *Developments in Food Science*, 28, 485-522.

Rapp, A., Versini, G., 1991. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wine. In J. M. Rantz (Ed.), *In: Proceedings of the international symposium on nitrogen in grapes and wines* (pp. 156-164). Davis, CA: American Society for Enology and Viticulture.

Rauhut, D., 1993. Yeasts - Production of sulfur compounds. In: Fleet, G. H. (Ed.). *Wine Microbiology and Biotechnology*, Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 183-223.

Reynier, A., 2003. Manuel de viticulture, Tec & Doc, Lavoisier, 548 p.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 2000. Handbook of enology, Vol. 2: The chemistry of wine and stabilization and treatments, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, p. 141.

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.

- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemistry Society Transactions*, 24, 790- 795.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2,152-159.
- Rivero-Pérez, M. D., Muñiz, P., González-Sanjosé, M. L., 2007. Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger capacity, and biomarkers of oxidative stress methodologies. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 5476-5483.
- Romano, P., 1990. La purezza fermentativa in *Saccharomyces cerevisiae*. *Industria delle Bevande*, 19, 320–321.
- Romano, P., Suzzi, G., 1993. Potential use for *Zygosaccharomyces* species in winemaking. *J. Wine Res.*, 4, 89–94.
- Rosa, C. A., Lachance, M. A, Teixeira, L. C. R. S., Pimenta R. S., Morais, P. B., 2007. *Metschnikowia cerradonensis* sp. nov., a yeast species isolated from ephemeral flowers and their nitidulid beetles in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 161–165.
- Rosini, G., 1984. Assessment of dominance of added yeast in wine fermentation and origin of *Saccharomyces cerevisiae* in wine-making. *Journal of General and Applied Microbiology*, 30, 249-256.
- Rossignol, T., Dulau, L., Julien, A., Blondin, B., 2003. Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast*, 20,1369–85.
- Rossouw, D., Toit, M. D., Bauer, F. F., 2012. The impact of co-inoculation with *Oenococcus oeni* on the transcriptome of *Saccharomyces cerevisiae* and on the flavour-active metabolite profiles during fermentation in synthetic must. *Food Microbiology*, 29, 121-131.
- Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J. M., 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiological Research*, 157, 267–274.
- Saez, J. S., Lopes, C. A., Kirs, V. E., Sangorrín, M., 2011. Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar

environment in Patagonia. *Food Microbiology*, 28, 503-509.

Salmon, J. M., 1997. Enological fermentation kinetics of an isogenic ploidy series derived from an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83, 253-260.

Sanni, A. I., Loner, C., 1993. Identification of yeasts isolated from Nigerian traditional alcoholic beverages. *Food Microbiology*, 10, 517-523.

Santamaría, P., Garijo, P., López, R., Tenorio, C., Gutiérrez, A. R., 2005. Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: Effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 49–56.

Schramm, D.D., Ygerman, J.B., 1998. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. *Journal of Nutrition & Biochemistry*, 9, 560-566.

Schuller, D., Valero, E., Dequin, S., Casal, M., 2004. Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiology Letters*, 231, 19-26.

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 Microbiology Ecology*, 51, 167–177.

Scott Laboratories, 2015. Disponível em: <<http://www.scottlab.com>> Acessado em: 11 junho 2015.

Settanni, L., Sannino, C., Francesca, N., Guarcello, R., Moschetti, G., 2012. Yeast ecology of vineyards within Marsala wine area (western Sicily) in two consecutive vintages and selection of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114 (6), 606-614.

Silva, F. C. C. da, Viana, A. P., Silva, M. G. O. da., 2008. Caracterização química e determinação dos estádios fenológicos de variedades de videiras cultivadas no Norte Fluminense. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30 (1), 38-42.

Singleton, V. L.; Rossi, J. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with hosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal Enology of Viticulture*, 16, 144-158.

Singleton, V. L., 1982. Grape and wine phenolics; back- ground and prospects. *In: Grape and Wine Centennial Symposium, Proceedings of the University of California, Davis*: 215–227.

Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.

Slinkard, K., Singleton, V. L., 1997. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49–55.

Soleas, G.J., Tomlinson, G., Diamandis, E. P., Goldberg, D. M., 1997. Relative contribution of polyphenolic constituents to the antioxidant status of wines: Devel- opment of a predictive model. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 3995–4003.

Stratford, M., Rose, A. H., 1985. Hydrogen sulphide production from sulphite by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of general microbiology*, 131, 1417-1424.

Stratil, P., Kubáň, V., Fojtová, J., 2008. Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. *Czech Journal of Food Sciences*, 26, 242–253.

Sun, Y., Guo, J., Liu, F., Liu, Y., 2014. Identification of indigenous yeast flora isolated from the five winegrape varieties harvested in Xiangning, China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105, 533–540.

Sun, Y., Liu, Y., 2014. Investigating of yeast species in wine fermentation using terminal restriction fragment length polymorphism method. *Food Microbiology*, 38, 201-207.

Suzzi, G., Arfelli, G., Schirone, M., Corsetti, A., Perpetuini, G., Tofalo, R., 2012. Effect of grape indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains on Montepulciano d'Abruzzo red wine quality. *Food Research International*, 46, 22–29.

Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., Pretorius, I. S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 139–173.

Swiegers, J. H., Pretorius, I. S., 2005. Yeast Modulation of Wine Flavor. *Advances in Applied Microbiology*, 57, 131–175.

Tao, Y-S., Li, H., 2009. Active volatiles of cabernet sauvignon wine from Changli County. *Natural Science*, 1 (3), 176-182.

TCW Equipment, 2015. Disponível em: <<https://store.tcwequipment.com>> Acessado em: 11 junho 2015.

Teixeira, A. H. de C., Bastiaanssen, W. G. M., Bassoi, L. H., 2007. Crop water parameters of irrigated wine and table grapes to support water productivity analysis in the São Francisco river basin, Brazil. *Agricultural Water Management*, 94, 31–42.

Thoukis, G., Stern, L. A., 1962. A review and some studies of the effect of sulfur on the formation of off-odors in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 13, 133–140.

Tofalo, R., Perpetuini, G., Fasoli, G., Schirone, M., Corsetti, A., Suzzi, G., 2014. Biodiversity study of wine yeasts belonging to the “terroir” of Montepulciano d’Abruzzo “Colline Teramane” revealed *Saccharomyces cerevisiae* strains exhibiting atypical and unique 5.8S-ITS restriction patterns. *Food Microbiology*, 39, 7-12.

Tonietto, J., Teixeira, A. H. C., 2004. Zonage climatique des périodes viticoles de production dans l’année en zonage tropicale: application de la méthodologie du Système CCM Géoviticole. In: Joint International Conference on Viticultural Zoning, Cape Town, South Africa [S.I.: s.n.], 193-201.

Tokuyama, T., Kuraishi, H., Aida, K., Uemura, T., 1973. Hydrogen sulfide evolution due to pantothenic acid deficiency in the yeast requiring this vitamin, with special reference to the effect of adenosine triphosphate on yeast cysteine desulfhydrase, *Journal of General and Applied Microbiology*, 19, 439–466.

Tristezza, M., Vetrano, C., Bleve, G., Spano, G., Capozzi, V., Logrieco, A., Mita, G., Grieco, F., 2013. Biodiversity and safety aspects of yeast strains characterized from vineyards and spontaneous fermentations in the Apulia Region, Italy. *Food Microbiology*, 36, 335-342.

Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Norinobu, S., Choi, S. W., Kawakishi, S., Osawa, T., 1994. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-β-D glucoside and cyanidin. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 42, 2407-2410.

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 Research*, 8, 1053–1062.

Vinson, J. A., Hao, Y., Su, X., Zubík, L., 1998. Phenol anti-oxidant quantity and quality in foods: vegetables. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 3630–3634.

Vos, P. J. A., Gray, R. S., 1979. The origin and control of hydrogen sulfide during fermentation of grape must. *American Journal of Enology and Viticulture*, 30, 187–197.

Vuleta, A., Jovanovic, S. M., Seslija, D., Tucic, B., 2010. Seasonal dynamics of foliar antioxidative enzymes and total anthocyanins in natural populations of *Iris pumilla* L. *Journal of Plant Ecology*, 3 (1), 59-69.

Wang, C., Liu, Y., 2013. Dynamic study of yeast species and *Saccharomyces cerevisiae* strains during the spontaneous fermentations of Muscat blanc in Jingyang, China. *Food Microbiology*, 33, 172-177.

Wang, J., Mazza, G., 2002. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 4183-4189.

Wildenradt, H.L., Singleton, V.L., 1974. The production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 25, 119–124.

Yang, B., Kotani, A., Arai, K., 2001. Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials. *Analytical Sciences*, 17, 599-604.

Zambonelli, C., 1964a. Ricerche biometriche sulla produzione di idrogeno solforato da solfati e solfiti in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Annali di microbiologia ed enzimologia*, 14, 129–141.

Zambonelli, C., 1964b. Ricerche genetiche sulla produzione di idrogeno solforato in *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus*. *Annali di microbiologia ed enzimologia*, 14, 143–153.

Zuzuarregui, A., Monteoliva, L., Gil, C., Del Olmo, M., 2006. Transcriptomic and proteomic approach for understanding the molecular basis of adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to

wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 836–847.