



## CAPÍTULO 9

# HISTÓRIA E USOS DE LEVEDURAS: CARACTERÍSTICAS DAS LEVEDURAS ISOLADAS PARA A REGIÃO PRODUTORA DOS VINHOS DE ALTITUDE DE SANTA CATARINA

Gildo Almeida da Silva

Bruna Carla Agustini

Sandra Denise Camargo Mendes

Loiva Maria Ribeiro de Mello

## INTRODUÇÃO

A seleção de microrganismos com aptidão para qualquer processo biotecnológico é uma das etapas mais importantes para a elaboração de produtos fermentados e, em especial, o vinho. Salienta-se que a elaboração de vinho não é e nem deve ser operada em condições estéreis. É, portanto, usual a atuação de vários microrganismos que habitam os cachos de uva e que também estão presentes no ambiente onde o mosto está sendo processado.

Em se tratando da elaboração de vinhos em regiões com Indicação Geográfica (IG), é relevante considerar a microbiota dessa região e estimular o emprego desses microrganismos selecionados no mesmo

local de onde foram isolados. Isto imprime uma característica ímpar ao produto elaborado, proporciona uma maior estabilidade aromática e reduz a variabilidade indesejável para aquela determinada região, sem anular ou eliminar as características intrínsecas de cada vinicultor.

Ao contrário de seu uso intencional, programado e seletivo, a participação de leveduras na elaboração do vinho é tão antiga quanto o próprio vinho. A levedura está envolvida na elaboração de vários outros produtos empregados pelo homem, como por exemplo, pão, cerveja e bebidas destiladas como cachaça, whisky e brandy. Pode-se extrapolar o uso de leveduras a outros igualmente importantes pro-

cessos fermentativos. O uso destinado à produção renovável de combustíveis líquidos tem apelo ecológico por apresentar potencial para substituir a produção não renovável de combustíveis líquidos fósseis. Para isso, aqui também é imperativo que se faça uma seleção rigorosa, especialmente aquela relacionada a elementos cinéticos como velocidade de fermentação e fator de conversão.

Observando a gama de participação das leveduras na atividade humana, não é de se estranhar que, em algum ponto da história e depois de terem sido descobertas como agentes vivos integrantes das transformações, o metabolismo destes microrganismos venha despertar interesse para os mais variados fins. Se para a produção de combustíveis há a necessidade de selecionar as melhores linhagens segundo algumas imprescindíveis características, na elaboração de um produto revestido de certa nobreza, como o vinho, a seleção de linhagens adequadas e o uso dessas linhagens são ainda mais prementes. Neste capítulo serão abordados os itens:

- Fermentação, levedura e história
- Leveduras e seus usos
- Aromas
- Coleção de Microrganismos de Interesse Agroindustrial (CMIA)
- Linhagens de leveduras coletadas em vinhedos da região de altitude de Santa Catarina
- Considerações finais

## **FERMENTAÇÃO, LEVEDURA E HISTÓRIA**

Há relatos feitos por arqueologistas evidenciando a produção de bebidas fermentadas na China desde 7 mil anos antes de Cristo (a.C.). Estas bebidas tinham apelo social, religioso e medicinal e eram elaboradas com mel, arroz e frutas, entre as quais se destacavam os frutos

do espinheiro e da videira. O fermentado era preservado em vasos de bronze das dinastias Shang e Zhou Ocidental. Estes achados ajudaram a elucidar as inscrições existentes nos oráculos da dinastia Shang (McGOVERN et al., 2004).

Caminhando um pouco mais para o ocidente, encontra-se o Irã com evidências de produção de bebidas fermentadas datadas de 6 mil anos a.C.. Esta evidência teve origem na descoberta de vasos feitos de argila destinados ao preparo e ao armazenamento de vinho. Vasos de 9 litros encontrados numa construção na região de Hajji Firuz Tepe têm idade de 5400 a 5000 a.C. (McGOVERN et al., 1997). Foi observado, nestes vasos, um resíduo vermelho. Em condições normais de temperatura, um mosto depositado num recipiente irá se transformar em vinho, por ação direta das leveduras presentes nos cachos de uva, no ambiente e nos utensílios. Ao ser analisado por uma bateria de análises químicas, análises por infravermelho e por cromatografia líquida, verificou-se se tratar de tartarato de cálcio. O ácido tartárico ocorre na natureza em grandes concentrações apenas nas uvas. Foram encontradas, junto ao vaso, tampas de argila com diâmetro aproximado da boca do vaso, indicando que este era usado para fechar o recipiente e assim evitar que o vinho elaborado se transformasse em vinagre (McGOVERN et al., 1997; BADLER, 1996; SINGLETON, 1996). A preocupação com a deterioração do vinho causada pela oxidação do etanol por bactérias acéticas parece ser também antiga, assim como também podia ser usual a técnica do atesto.

A atividade vitivinícola tem sido observada na região do Vale do Jordão com data estimada de 4000–3500 a.C. (idade do cobre) e 3300–3000 a.C. (idade do bronze). Como as condições dessa região não são propícias para o plantio da uva selvagem (*sylvestris*), as sementes encontradas devem ter sido de um cultivar domesticado e transplantado para o Vale do Jordão (McGOVERN et al., 1997). Talvez seja esse o primeiro fato relacionado com melhoramento genético de videira, visando à adaptação da planta ao ambiente, que se tenha co-

nhecimento. Comunidades neolíticas que se estabeleceram nas regiões altas das montanhas Zagros, Taurus e Cáucaso podem ter sido as que deram início às atividades relacionadas à vitivinicultura. Sementes de uva domesticadas foram encontradas nas regiões das montanhas do Cáucaso com datas do início do sexto milênio a.C. e ao longo do rio Kura na Transcaucásia (rio este que nasce na parte oriental da Turquia, entra na Geórgia, vai ao Azerbaijão, percorrendo 1.364Km até desaguar no Mar Cáspio), com datas estimadas entre o sexto e quarto milênios a.C. (McGOVERN et al., 1997; BADLER, 1996).

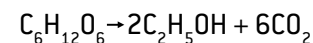
No Egito, o cultivar selvagem nunca foi cultivado, mas havia uma vinícola real no Delta do Nilo na dinastia 3 (2700 a.C.), no início do antigo império. Os vinhos elaborados tinham, provavelmente, sua origem em videiras domesticadas provenientes da região do Levante, que corresponde, aproximadamente, às áreas que abrangem Israel, Jordânia, Síria e Iraque. No final deste império, havia cinco vinhos, muito provavelmente elaborados no Delta do Nilo, que faziam parte de ritos canônicos de provisões para a vida após a morte (McGOVERN et al., 1997). Mais uma vez o vinho entra no espírito religioso das civilizações. Convém salientar que isso só era possível graças à matéria-prima, a uva, e ao agente transformante, a levedura.

No início do século XIX, a abordagem sobre a existência de agentes microscópicos vivos era motivo de calorosos debates. Nem mesmo a população tinha conhecimento de que microrganismos poderiam estar envolvidos direta e indiretamente com doenças e muitas delas graves. Até o século XX, nem mesmo a existência de enzimas intracelulares estava completamente estabelecida, chegando ao ponto de um renomado cientista (Eduard Pflüger) proferir a seguinte frase: “A existência de enzimas intracelulares não apenas era desnecessária como também implausível”. Tudo foi se elucidando com o advento da bioquímica, criada graças aos estudos das fermentações perpetrados por químicos e biólogos. Não foi fácil relacionar levedura com o processo fermentativo. Entre 1789 e 1815 foi publicada a primeira importante análise química

de fermentação alcoólica. Antoine-Laurent de Lavoisier, em 1789, descreveu o fenômeno da fermentação alcoólica, chegando a escrever:

mosto de uva = ácido carbônico + álcool

Lavoisier foi condenado à morte por guilhotina e em 8 de maio de 1794 foi executado, aos 41 anos de idade, devido a sua ligação com a “Ferme Générale”, uma espécie de taxação de impostos na França, assunto extremamente impopular. Mas Gay-Lussac, em 1815, revisando os dados de Lavoisier, encontrou valores bem próximos aos que hoje temos, para a relação entre o açúcar consumido e o álcool e CO<sub>2</sub> produzidos. Atribuir o desenvolvimento da equação:



a Gay-Lussac é atropelar a cronologia dos fatos e, portanto, não é verdadeiro, pois nessa época nem mesmo a fórmula empírica da glicose tinha sido estabelecida, vindo a ser publicada por Dumas, em 1843. Além disso, a fórmula molecular não era conhecida antes das publicações de Baeyer, em 1870 e Fittig, em 1871. Quando Gay-Lussac morreu, em 1850, não se sabia a fórmula molecular da glicose e nem a equação acima estava definida, o que só veio a acontecer no início do século XX.

Essas transformações observadas por Lavoisier e abordadas por Gay-Lussac foram estudadas com mais afinco no século XIX. Com isso ficou demonstrado que as leveduras eram microrganismos e que também eram as responsáveis pelas fermentações. Estes achados provocaram um verdadeiro alvoroço nos meios científicos. Os mais fervorosos ataques vieram de cientistas influentes que não acreditavam que leveduras eram seres vivos (BARNETT, 2003). Mas só depois da metade do século XIX que foi definido, de uma vez por todas, por Luis Pasteur, que a fermentação alcoólica era, de fato, o resultado da ação de mi-

croorganismos. Mas foram os estudos sobre a fermentação alcoólica durante elaboração de vinho e da cerveja, efetuados por Charles Cagniard-Latour, Friedrich Kützing e Theodor Schwann, que mostraram o papel das enzimas no metabolismo celular. Toda a pesquisa teve início com a descoberta feita por esses três pesquisadores afirmando que as leveduras eram organismos vivos. Os avanços na área da microscopia tiveram seu relevante papel nas investigações que levaram a esta descoberta. Cagniard-Latour afirmou: “A conexão entre a fermentação no processo de elaboração de vinho e o desenvolvimento dos fungos do açúcar não é para ser subestimada”. Schwann afirma: “Assim como na putrefação, não é o oxigênio do ar que realiza a fermentação, como sugerido por Gay-Lussac, mas por algo no ar que é destruído pelo calor”.

A produção de bebidas alcoólicas é um fenômeno quase que universal. Esse fato pode ser explicado pelos efeitos que o etanol causa no ser humano. Por um lado, atua como analgésico, desinfetante e provoca uma profunda alteração mental. Por outro lado, age sobre produtos alimentícios, ajudando no processo de conservação, aumentando o valor nutricional e trazendo benefícios sensoriais (McGOVERN et al., 2004). De um modo geral, este componente está envolvido com aspectos religiosos, alimentícios e medicamentosos (VALLEE, 1998). O vinho é considerado um alimento de dupla face. Talvez seja o único alimento a ter essa dicotomia claramente definida. É louvado quando consumido com moderação e condenado quando consumido em excesso (GRIVETTI, 1996).

## LEVEDURAS E SEUS USOS

Antes de 1850, mesmo sem saber que se tratava de organismos vivos, as padarias obtinham leveduras para pão a partir de cervejarias, as quais passaram a comercializar o produto. Esta atividade foi denominada “processo holandês”. Tebbenhof foi o primeiro a encontrar uma

forma de processar leveduras, extraindo a umidade e transformando a massa microbiana em cubos. Em 1867, Reimingham melhorou a manufatura de leveduras para pão usando filtro prensa, um processo chamado de Vienense. Este sistema de prensagem de leveduras ultrapassou fronteiras e até hoje é usado na Europa. Charles Fleischmann levou essa tecnologia para os Estados Unidos.

As leveduras foram um dos primeiros microrganismos a serem estudados cientificamente. Há duas razões para esse pioneirismo. Uma delas era a facilidade de visualização e manuseio, visto que as células são razoavelmente grandes quando comparadas com as de bactérias. A outra razão é a importância econômica atrelada às indústrias de fermentação alcoólica. Poderiam ser citadas ainda outras razões. Estas envolvem os seguintes aspectos: As leveduras são versáteis e apresentam particularidades próprias para propósitos industriais específicos, geralmente crescem em ambientes onde bactérias não podem crescer de forma adequada, são de manutenção mais simples, podem se manter mais facilmente em condições livres de contaminações por microrganismos de crescimento rápido, são de mais rápida recuperação que bactérias e, por fim, alguns destes organismos crescem na presença ou na ausência de ar, embora ineficientemente nesta última condição.

O uso industrial de leveduras ainda está em pleno desenvolvimento e é de suma importância aumentar a disponibilidade desses indivíduos para os mais variados fins. Leveduras, além de serem empregadas na produção de pão e na fermentação alcoólica, têm sido usadas em outros processos igualmente importantes. Podem ser empregadas na transformação da lactose e metanol, na produção de proteínas a partir de alcanos e resíduos de indústrias de papel, na formação de glicerol ou D-Glucitol, na produção de determinadas enzimas, como  $\beta$ -D-galactosidase,  $\beta$ -D-frutofuranosidase e lipase, de novas pontes carbono-carbono, de compostos opticamente ativos, na síntese de produtos naturais e na produção de moléculas biologicamente ativas. Leveduras podem ainda atuar na transformação de precursores inodo-

ros em agentes aromaticamente ativos e ainda participar em sistemas de controle biológico e ser empregado como agente probiótico.

O gênero *Saccharomyces* e a espécie *Saccharomyces cerevisiae* é de longe o organismo mais usado industrialmente, embora haja outros gêneros mais versáteis, mas pouco explorados. Para a produção de ácido duodecanoico (láurico) e seus derivados pode ser empregada a espécie *Candida tropicalis*, para a formação de prostaglandina são usadas as espécies *Rhodotorula rubra*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Zygosaccharomyces bailii*. Açúcares que não são usados por *Saccharomyces cerevisiae* podem ser utilizados por outras espécies. A xilose, por exemplo, não é assimilada por *Saccharomyces cerevisiae*, mas é assimilada e metabolizada por *Candida utilis*, *Pachysolen tannophilus* e *Scheffersomyces stipitis* (*Pichia stipitis*). É relevante encontrar linhagens para a produção de proteínas heterólogas para uso clínico. Para esse fim, a espécie candidata é a levedura *Komagataella pastoris* (*Pichia pastoris*). Embora a manipulação genética possa contribuir para aumentar a versatilidade das linhagens, muitos processos não permitem o uso de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs). A natureza é pródiga em disponibilizar microrganismos com versatilidades múltiplas.

## AROMAS

O desafio para os produtores de vinhos é elaborar um vinho com notoriedade e, em grande parte, satisfazer os consumidores. Um vinho deve, em poucos segundos, acionar os cinco sentidos, criando diferentes sensações resultantes de um conjunto complexo de interações. Pretorius (2016) faz um paralelo metafórico entre a composição musical e a elaboração do vinho, pois são expressões da criatividade e imaginação humana. Os atores desta metáfora são os produtores que compõem as notas no vinhedo. O enólogo interpreta e conduz a composição original com seus instrumentos de escolha na vinícola, tendo como objetivo

atender as expectativas de seu público em um mercado consumidor específico. Nesta composição, a espécie *Saccharomyces cerevisiae* e outras espécies do gênero desempenham papel importante.

## PRODUÇÃO DE AROMAS POR *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

O vinho é um produto de reações bioquímicas sequenciais governadas por microrganismos, em especial, por leveduras. As características distintas do vinho são resultantes da interação entre o tipo de uva, a tecnologia de elaboração, as linhagens de leveduras e o ambiente. As substâncias de aroma ativo produzidas por meio da fermentação são divididas em seis grupos principais: ácidos orgânicos, alcoóis superiores, ésteres voláteis e compostos fenólicos de carbonil e sulfurados (Figura 9.1). Os ésteres voláteis, em bebidas fermentadas, compreendem o conjunto mais importante de compostos de aromas ativos derivados de levedura.

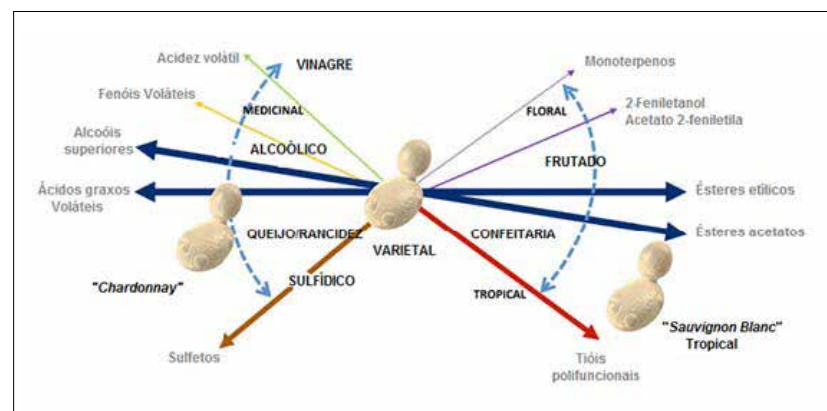


Figura 9.1. Características aromáticas que linhagens de leveduras da espécie de *Saccharomyces cerevisiae* podem apresentar. As setas sólidas estão dispostas de acordo com magnitude do impacto. Figura adaptada de CORDENTE et al. (2012)

O processo fermentativo leva à formação de uma mistura complexa de produtos que enriquecem o aroma e o sabor, tanto de alimentos fermentados quanto de bebidas obtidas por fermentação (LILLY et al., 2006). A fermentação de açúcares por leveduras da espécie *Saccharomyces* leva à formação de uma grande quantidade de metabólitos voláteis que contribuem para o perfil sensorial do vinho. Estes metabólitos pertencem a diferentes classes como ésteres, alcoóis superiores, ácidos graxos voláteis, carbonilas e compostos sulfurados. O acúmulo destes compostos no vinho é influenciado pela linhagem de levedura, pela composição físico-química, pelos nutrientes do mosto e pelas condições de fermentação. Muitos compostos voláteis também são liberados a partir de precursores inodoros presentes na uva, que são transformados por enzimas em compostos aromáticos (MORENO-ARRIBAS et al., 2008).

A contribuição de um composto químico, identificado no aroma global no vinho para percepção humana, pode ser determinada pelo valor de odor ativo (VOA) e pela contribuição relativa de odor (CRO). O valor da atividade olfativa é indicador da importância de um composto específico para o aroma no vinho estudado. Este valor é obtido calculando-se a relação entre a concentração do composto individual e o limiar de percepção descrito na literatura (VILANOVA et al., 2012). A contribuição relativa de odor (CRO) indica o percentual de cada composto volátil com VOA > 1. Num trabalho efetuado na Epagri, a levedura *Saccharomyces mikatae* VM26, isolada de um vinhedo em Campo Belo do Sul, foi usada para fermentar o mosto da uva Sauvignon Blanc proveniente de São Joaquim. Foram considerados importantes para contribuição global do aroma apenas os componentes que atingiram o índice de VOA > 1 (VILANOVA et al., 2012).

O método quantitativo, combinado com a determinação do CRO, revelou quais os compostos de maior importância em relação ao aroma da amostra de vinho analisada. Após a fermentação, o CRO dos compostos  $\beta$ -ionona, lactato de etila,  $\beta$ -pineno, tioacetato de S-furfurila,

$\gamma$ -nonalactona, cinamato de etila entre outros compostos é de 99,9% da complexidade dos aromas do vinho. Foi verificada uma forte influência da composição da uva na formação de compostos de aroma ativos por outras espécies pertencentes ao gênero *Saccharomyces* com os seguintes descritores: florais, frutados, especiarias e tostado, que são os mais relevantes para caracterizar o efeito do aroma (Figura 9.2). O papel da levedura *Saccharomyces mikatae* VM26 deve ser destacado, visto que os compostos predominantes observados neste estudo são derivados do metabolismo microbiano e dependem da disponibilização dos precursores durante a fermentação.

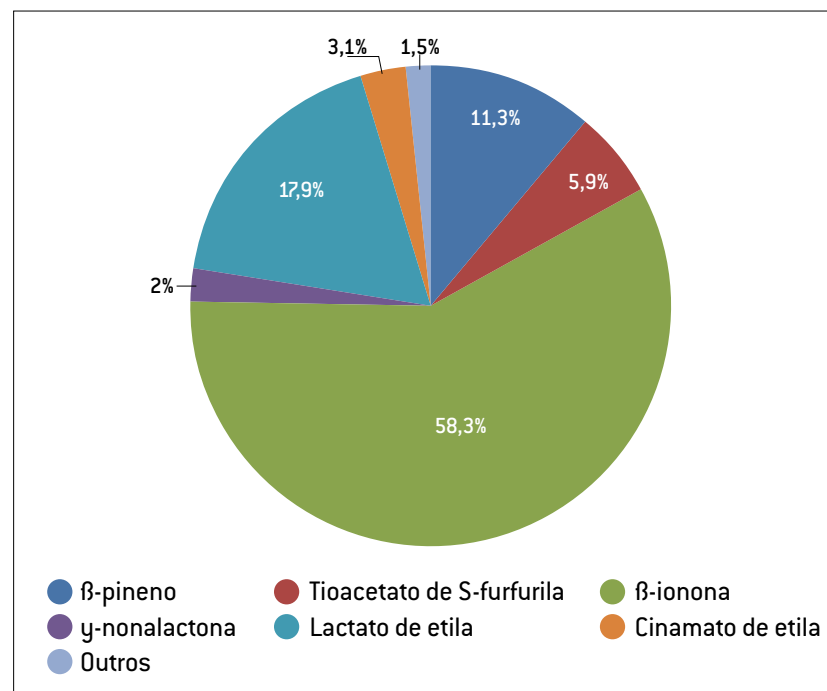


Figura 9.2. Contribuição relativa ao odor (ROC) pela levedura pertencente *Saccharomyces mikatae* VME26

## COLEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE AGROINDUSTRIAL (CMIA)

A Coleção de Microrganismos da Embrapa Uva e Vinho reúne leveduras de diversas regiões do Brasil com vocação enológica e envolvidas no processo de requerimento da Indicação Geográfica na região produtora de vinhos de altitude em Santa Catarina. Ela se empenha na busca de diferentes tipos de leveduras nativas com capacidade de formar distintos compostos ou de atuar em processos específicos. Determinar as características das linhagens é uma das etapas de maior relevância, porque o emprego de uma determinada linhagem vai depender dessa discriminação. São várias as etapas que devem ser rigorosamente cumpridas para que se alcance o objetivo da escolha. Todos os principais estádios para a seleção são conduzidos no Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) da Embrapa Uva e Vinho com o propósito de atender a demanda das diferentes IGs distribuídas em todo o Território Nacional relacionada à elaboração de vinhos. Há nessa coleção cerca de 4.500 linhagens de levedura.

Dentro de um mesmo propósito, como, por exemplo, a elaboração de vinhos, há uma elevada gama de finalidades que podem ser levadas em consideração quando se fala do uso de leveduras em processos industriais. Cabe ressaltar que quando se fala de levedura, seja para elaboração de vinho, seja para outro processo qualquer, não se deve ter como sinônimo a espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Envolve também linhagens não-*Saccharomyces*, pois estas podem dar contribuições valiosas ao produto elaborado. Conhecer a flora de uma determinada região, assim como sua identidade e seu metabolismo, respeitar essa flora e usar estes recursos biológicos naturais são atitudes quase que obrigatórias de quem quer distinção regional, sem perder as peculiaridades individuais de cada vinicultor. O emprego de leveduras comerciais de uso geral reduz o potencial de discriminação local, deixando de explorar o potencial das linhagens autóctones em

imprimir características únicas aos produtos daquela específica região. Salienta-se que o vinho é um produto resultante de uma complexa interação entre os componentes da matéria-prima – leveduras, fungos filamentosos e bactérias. Não há dúvida de que, entre outros, o cultivar e o sistema de cultivo imprimem os fundamentos do *flavor* do vinho. Mas a sutileza e a individualidade são fenômenos impostos pelos microrganismos presentes no processo de elaboração do vinho. Como consequência, é importante entender as potencialidades individuais e as interações entre gêneros, espécies e linhagens. Isso tudo implica as etapas abaixo especificadas, um processo que se inicia com a coleta e termina na disponibilização das linhagens selecionadas para aquela determinada IG.

As atividades relacionadas ao conhecimento da microflora estão divididas nas etapas que se seguem:

- Coleta
- Isolamento
- Preservação
- Caracterização
- Identificação taxonômica
- Disponibilização

### Coleta

Embora muito se saiba sobre a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, incluindo seu genoma, sua ecologia é um dos poucos aspectos ligados a sua biologia que ainda gera incertezas e por isso precisa ser esclarecida. Se se deseja vincular o indivíduo à sua origem, algumas precauções devem ser tomadas com relação à coleta.

A coleta de microrganismos é uma das etapas mais importantes para vincular os microrganismos encontrados e suas características ao



local da coleta (área geográfica de IG). O procedimento de coleta deve garantir a exatidão do vínculo. Por isso, esta etapa, assim como a seguinte, tem que ser efetuada por pessoal experiente e cuidadoso, pois os microrganismos presentes nas amostras coletadas devem representar a região, sendo esse o vínculo e o compromisso da tecnologia no processo de seleção de microrganismos para uma Indicação Geográfica.

É fundamental que o recipiente coletor seja estéril, esteja fechado e que só seja aberto no local da coleta. Uma vez feita a coleta, o recipiente deverá ser novamente fechado e transportado para o laboratório onde será efetuado o isolamento em condições estéreis. Todos os microrganismos coletados, isolados e identificados no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Embrapa Uva e Vinho estão cadastrados no SisGen.

## **Isolamento**

O cuidado com o manuseio da amostra nesse momento deve ser o mesmo que aquele tomado para a coleta. O isolamento deve ser efetuado de tal forma que as leveduras obtidas sejam de fato provenientes da região da coleta e de forma alguma sejam do ambiente do laboratório e nem do ambiente do trajeto entre o local da coleta e o laboratório. O procedimento de isolamento se faz empregando meios específicos de forma a permitir que se obtenha o maior número e a maior diversidade possíveis de microrganismos.

O procedimento de isolamento de microrganismos segue praticamente o mesmo padrão com variações com relação a meios de cultivo e condições de cultivo. Tem como base os mesmos princípios definidos na década de 1880 por Hansen, quando introduziu a técnica de obtenção de culturas puras. Até hoje este procedimento é usado para isolamento, embora haja controvérsias com relação à justa representatividade dos indivíduos de uma comunidade microbiológica. Ninguém

garante que as condições de cultivo e de meio de cultivo sejam ideais para todos os presentes. Os que estão em maior número podem se beneficiar e, como resultado, sempre estão predominantemente presentes. Além do mais, o mecanismo de diluição, imprescindível para o isolamento, pode exercer pressão de exclusão de modo que aqueles que habitem a superfície da baga em baixíssima concentração não possam ser isolados. Toda essa problemática é antiga, ainda persiste e, ao mesmo tempo, permanece longe de ser realmente resolvida.

## **Preservação**

A manutenção de microrganismos foi sempre um desafio. As leveduras são consideradas robustas, pois sobrevivem em condições desfavoráveis. Embora robustas, os métodos de preservação comumente usados têm como resultado baixos níveis de sobrevivência. Não se sabe ainda o motivo da perda da viabilidade. O método escolhido para a manutenção das culturas da Coleção de Microrganismos de Interesse Agroindustrial (CMIA) da Embrapa Uva e Vinho foi o da preservação a baixas temperaturas. Os microrganismos isolados são tratados com crioprotetor duplo e submetidos à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . A criopreservação é um procedimento que consiste em suspender células vivas em solução salina juntamente com uma ou duas substâncias orgânicas de baixo peso molecular, mantendo esta suspensão a temperaturas muito baixas, de modo que a suspensão, ao ser descongelada, permita que os organismos, assim mantidos, voltem a desempenhar sua função original. É um processo que praticamente paralisa as atividades metabólicas das leveduras, não permitindo que alterações genéticas espontâneas ocorram. As leveduras da CMIA estão suspensas em sacarose, tampão citrato-fosfato  $\text{MgSO}_4$  e glicerol e mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Pode-se também proceder a liofilização, processo esse caracterizado pela sublimação. O gelo da amostra congelada passa diretamente

do estado sólido para vapor. A sobrevivência das leveduras submetidas à liofilização não é alta e é linhagem dependente. Generalizações com relação a esse item devem ser tomadas com cuidado. Sobre os níveis de viabilidade, há relatos mostrando que a liofilização pode reduzir para 5% a viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae*; para 13% a viabilidade da *Candida albicans* e para 2% a da levedura *Brettanomyces* (KIRSOP, 1984). Todos estes mecanismos de preservação têm como objetivo reduzir ou até mesmo paralisar o crescimento e assim evitar que o microrganismo perca as características fisiológicas originais. Caso contrário, estes microrganismos podem sofrer alterações genéticas espontâneas, podendo formar substâncias indesejáveis antes não produzidas, deixar de sintetizar aromas intrínsecos importantes resultantes do metabolismo ou deixar de exibir atividades glicosidásicas necessárias ao desenvolvimento de aromas a partir de precursores inodoros da uva.

## Caracterização

A caracterização difere da identificação taxonômica por se tratar da capacidade específica de formar substâncias durante sua atividade metabólica. As características básicas que são investigadas para a seleção de leveduras para a elaboração de vinho que está se considerando são: velocidade de fermentação, produção de  $H_2S$ , presença de plasmídeos responsáveis pela formação de proteína killer, resistência ao fator killer e sensibilidade a este fator. Todas estas características são linhagens dependentes. Linhagens killer só atuam como tal diante de linhagens sensíveis e essa atuação independe do gênero ou da espécie de levedura. Assim, uma *Issatchenkia terricola* killer pode matar *Saccharomyces cerevisiae* e essa mesma linhagem ser sensível a linhagens de *Candida diversa*. Do mesmo modo, uma *Saccharomyces cerevisiae* pode ser killer para uma outra linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* e ao mesmo tempo ser sensível a linhagens killer de *Hanseniaspora opuntiae*.

Os testes killer são efetuados com seis linhagens padrão, sendo 5 não-*Saccharomyces* e uma *Saccharomyces cerevisiae*. A avaliação de sensibilidade das linhagens isoladas envolve três linhagens killer padrão de *Saccharomyces cerevisiae* e 22 linhagens de levedura killer padrão de não-*Saccharomyces*, dentre estas estão as espécies *Candida diversa*, *Hanseniaspora opuntiae* e *Hanseniaspora uvarum*. Todas as linhagens que serviram como padrão pertencem à CMIA da Embrapa Uva e Vinho, com exceção da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* K1 (Lallemand).

Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com velocidade de fermentação baixa podem permitir que linhagens de outros gêneros atuem de forma intensa, podendo alterar o trajeto desejado da fermentação, por formar aromas indesejáveis e incorporá-los ao produto final. Alguns destes compostos indesejáveis possuem limiar de percepção muito baixo, o que reforça a necessidade de sua ausência no vinho. Um desses compostos é o  $H_2S$ . Por isso, é aconselhável caracterizar as linhagens da microflora mesmo antes de sua identificação taxonômica. Linhagens com esta característica não devem participar do processo de elaboração de vinhos.

A população de levedura muda constantemente devido às condições climáticas e ao estágio de maturação da uva. No momento da colheita, a população é tão complexa quanto complexa também é sua atividade. Um detalhe chama a atenção nos parreirais da região de produção dos vinhos de altitude de Santa Catarina e de outras indicações geográficas. A levedura de maior atividade fermentativa, *Saccharomyces cerevisiae*, se presente, não está em maior número. Há relatos semelhantes na vitivinicultura europeia. Estudos de Mortimer & Polsinelli (1999) relatam que entre mil bagas avaliadas, apenas uma baga de uva teve resultado positivo para *Saccharomyces cerevisiae*. Da mesma forma, estudos de Vaughan-Martini & Martini (1995) demonstraram que, de 2.016 tubos de ensaio contendo meio estéril e cada qual com uma baga de uva, apenas um tubo apresentou fermentação completa com a presença de *Saccharomyces cerevisiae*.

## Identificação taxonômica

Será esboçado o conceito básico de sistemática, tendo como foco principal a identificação, pois é exatamente isso que é feito com as linhagens obtidas de várias IGs. A sistemática biológica, segundo Barnett et al. (1990), inclui:

1. Taxonomia - estuda a classificação e a identificação
2. Classificação - promove o agrupamento de organismos em “taxa” (reino, filo, classe, ordem, família, gênero, espécie) de acordo as similaridades e/ou relações ancestrais
3. Identificação - compara um indivíduo desconhecido com indivíduos similares já nomeados
4. Nomenclatura - refere-se à nomeação de “taxa” aceitos.

Pelo exposto, fica claro que a caracterização e a identificação são procedimentos distintos e possuem objetivos diferentes. Os métodos de identificação, ao longo da história, tiveram vários avanços. Parte-se do princípio de que a mais importante unidade da taxonomia de levedura é a espécie. Para se chegar à identificação de uma espécie, unidade taxonômica, pode-se empregar métodos fenotípicos e genotípicos: No Laboratório de Microbiologia Aplicada da Embrapa Uva e Vinho, a sequência de técnicas para a identificação das linhagens de leveduras tem a seguinte ordem:

1. Espectrometria de Massa Maldi - TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight)
2. Biologia molecular
3. Tradicional

## Tradicional

Resumidamente pode-se afirmar que a identificação pelo processo tradicional leva em consideração aspectos importantes, mas por haver métodos mais rápidos, menos fastidiosos, menos laboriosos e mais seguros, ela tem sido substituída por tecnologias mais modernas que eliminam todos esses obstáculos. Além de tudo isso, há necessidade de pessoal experiente e com critérios para definir morfologias específicas, meios de cultivo especiais e condições de cultivo próprios para a expressão estrutural. Em alguns casos, ainda hoje se aplica na discriminação de espécies muito próximas. Entre os critérios para a identificação pelo método clássico estão as características relacionadas com os aspectos microscópicos das células, com o tipo de reprodução, com a forma da reprodução sexuada, com as atividades fisiológicas e com as características bioquímicas.

Pesquisas citológicas tiveram início nas décadas de 1870 e 1880 com o avanço dos microscópios ópticos e das técnicas de coloração de células e tecidos. Foi o ramo da biologia que atraiu mais pesquisas na época, induzindo pressa exacerbada em publicar, o que muitas vezes gerava publicações precipitadas. Os avanços dados nas objetivas, corrigindo aberrações esféricas e cromáticas, foram os mais significativos. Em 1987, Ernst Abbe foi quem melhorou a performance de lentes com aberturas numéricas altas. A manufatura de lentes teve também suas melhorias. Mesmo sem as melhorias citadas, em 1835, o conteúdo do citoplasma foi visto e foi chamado de “sarcode”. De 1838 a 1840, a estrutura celular foi observada e foi nessa época que se introduziu o conceito de protoplasma. Em 1848, observou-se a divisão nuclear, em 1882 foi observada a mitose, em 1888, foi introduzido o termo cromossomo e a meiose foi observada em 1892. As estruturas celulares de levedura foram observadas a partir de 1879. Não é de se estranhar que na identificação de leveduras pelo processo tradicional a microscopia tenha tido um destaque muito mais proeminente que em qualquer outro método de identificação.

Os testes bioquímicos de fermentação (zimograma) e de assimilação (auxanograma) de açúcares tiveram um papel preponderante. São geralmente empregados 14 testes para zimograma, 44 fontes de carbono para auxanograma, nove fontes de nitrogênio, dez vitaminas, cinco temperaturas de crescimento, cinco produtos especiais e a observação de quatro atividades especiais. Por este quadro de avaliação, não é difícil entender o motivo da demora em se identificar uma espécie pelo processo clássico.

### **Biologia Molecular**

O emprego da biologia molecular na identificação de leveduras trouxe um avanço significativo, uma vez que resolveu muitos dos problemas inerentes ao processo clássico de identificação. Entre os procedimentos mais empregados estão o PCR (Polimerase Chain Reaction - Reação em Cadeia da Polimerase) da região ITS1 5.8S-ITS2 do rDNA, determinação do perfil de restrição por PCR-RFLP, obtido com enzimas de restrição e sequenciamento da região D1/D2 do rDNA. A PCR é tão sensível que é capaz de amplificar uma única molécula de DNA e genes de uma simples cópia são rotineiramente extraídos de uma mistura de sequências genômicas, amplificados e visualizados como bandas distintas (INNIS & GELFAND, 1990).

Esta técnica de identificação só é empregada pelo Laboratório de Microbiologia da Embrapa Uva e Vinho para as linhagens da Coleção, caso o espectro gerado pelo Maldi-TOF não possibilite uma identificação segura. Portanto, a grande maioria das linhagens isoladas da Indicação de Procedência (IP) Vinhos de Altitude de Santa Catarina foi identificada por Maldi-TOF/MS. O método de identificação a seguir é o de preferência, pela rapidez, pelo baixo custo operacional, acurácia e precisão.

### **Maldi-TOF/MS**

Até recentemente, a identificação de microrganismo tinha sua modernidade associada às técnicas de biologia molecular, como citadas acima. Com o advento de ferramentas ainda mais modernas, como esta que está sendo agora descrita, a biologia molecular não deixou de ser um importante mecanismo de identificação a ser empregado. Como foi mencionado, a técnica de biologia molecular é imprescindível para implementar bibliotecas de identificação com base em Maldi-TOF/MS. Os pesquisadores que contribuíram para o desenvolvimento do Maldi-TOF/MS foram agraciados com a metade do Prêmio Nobel 2002, dividida entre Koichi Tanaka e John Fenn. Nesse mesmo prêmio, a outra metade foi para Kurt Wüthrich, pelo desenvolvimento de espectroscopia de ressonância magnética nuclear para a determinação da estrutura tridimensional de macromoléculas biológicas. Os alemães Franz Hillenkamp e Michael Karas, na década de 1980, também contribuíram de forma definitiva para o desenvolvimento do Maldi, mas não foram agraciados com o prêmio.

Maldi é uma sigla em inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*, que corresponde em português a “Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz”. Como se vê, há nesta sigla duas importantes ações. Uma se refere ao contato da amostra com uma matriz, com função ionizante, e a outra reporta à aplicação de tiros de raios laser para que haja ionização da amostra. Logo em seguida, as moléculas são aceleradas em um campo elétrico. Esta fase termina com a aceleração das moléculas que sofreram dessorção para dentro de um tubo metálico com vácuo.

TOF é outra sigla em inglês que significa *Time Of Flight*, o que corresponde em português a Tempo de Voo. As moléculas carregadas e que sofreram dessorção no Maldi são aceleradas por meio de um campo eletrostático, ou seja, são praticamente forçadas a migrar para dentro de um tubo metálico com vácuo, chamado tubo de voo ou de

tubo separador, onde irão encontrar, no final do trajeto, um equipamento que detecta a chegada de cada uma dessas moléculas.

MS é uma sigla inglesa que se refere a *Mass Spectrometer*, na tradução para o português, Espectrômetro de Massa. Esse é o equipamento que detecta a chegada das moléculas no seu destino final. Como estas moléculas viajam dentro do tubo de voo com velocidades diferentes que dependem da relação massa/carga ( $m/z$ ), o detector (MS) se comporta também como um cronômetro de corrida, marcando o tempo de voo (TOF) de cada molécula. As moléculas separadas pelo tempo de voo (TOF) criam um espectro de massa que é composto pelos picos massa/carga ( $m/z$ ) com intensidades variadas. Este espectro representa uma assinatura daquela levedura desconhecida. Esta assinatura deve ser comparada com outras assinaturas previamente determinadas, presentes num banco de dados (biblioteca), podendo ter ou não sua firma reconhecida, tal qual o reconhecimento de uma assinatura num cartório de registro. Obviamente, assinaturas de leveduras do ambiente podem não ter assinaturas correspondentes no banco de dados (biblioteca).

Agora fica fácil entender a principal dificuldade encontrada na identificação de leveduras por esse método. Se a firma não for reconhecida, o microrganismo tem que ser identificado por outro método. A técnica de identificação que se usa no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Embrapa Uva e Vinho é a biologia molecular citada acima. No caso de leveduras da coleção CMIA, onde estão as leveduras da IP Vinhos de Altitude de Santa Catarina, estas são identificadas por PCR-RFLP da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA. Se ainda assim não for possível a identificação com enzimas de restrição (RFLP), usa-se o sequenciamento dessa mesma região ou da região D1/D2 do rDNA. Dependendo da espécie, pode ocorrer que nem o sequenciamento resolva a separação entre duas espécies muito próximas. Neste caso, recorre-se a técnicas mais antigas, como auxanogramas e zimogramas para efetuar a discriminação. Uma vez identificada a espécie, cria-se um banco de dados ao qual se dá o nome de biblioteca suplementar.

## Disponibilização

A disponibilização de microrganismos para uso em projetos de pesquisa e, em especial, para fins industriais é o propósito principal de uma Coleção. Dessa forma atuam as coleções internacionais, como a da Holanda The Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre (CBS), da Alemanha Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), da Bélgica Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM/LMG), entre outras. Todo o empenho para discriminar e manter microrganismos se torna ainda mais motivador, quando a estas atividades estão vinculados os conceitos de Indicação Geográfica. Há várias formas de disponibilização de leveduras. Estas são:

- **Líquida (Creme)** – Trata-se de uma suspensão de células de leveduras em plena atividade, para ser empregada em indústrias e raramente para uso doméstico. Neste processo, as leveduras estão metabolicamente ativas, o que reduz significativamente a fase de adaptação, conhecida como “lag-phase”, e tem ainda como pontos positivos a simplicidade operacional do uso da levedura e o apelo artesanal peculiar do processo de vinificação.
- **Comprimida** – É feita do creme de levedura onde grande parte da água é removida. É para uso industrial e caseiro.
- **Seca ativa** – As leveduras secas vivas são extrudadas, formando grânulos e encapsuladas numa fina camada de células mortas. Devem ser usadas com prévia hidratação. As leveduras assim tratadas podem ser estocadas por 1 ano sob temperatura ambiente ou por 10 anos se congeladas. Estas são usadas tanto em indústrias vinícolas quanto para uso doméstico.
- **Instantânea** – São semelhantes às leveduras secas ativas, mas os grânulos apresentam diâmetros menores. Conservam-se por período de tempo menor que as secas ativas, não há necessidade de hidratação e são indicadas para uso doméstico.

- **De levantamento rápido** – É um tipo de levedura seca de grânulos menores que pode ser adicionada diretamente à massa do pão. Apresenta uma evolução de CO<sub>2</sub> mais rápida, fazendo com que a massa aumente de volume de forma mais célere. É indicada para máquinas de fazer pão.

### LINHAGENS DE LEVEDURAS COLETADAS EM VINHEDOS DA ÁREA PRODUTORA DOS VINHOS DE ALTITUDE DE SANTA CATARINA

Na área geográfica de produção de vinhos de altitude de Santa Catarina, foi realizada a coleta de leveduras para a obtenção do conhecimento da microflora regional e discriminação das linhagens de levedura com potencial para uso em seus sistemas de vinificação de modo a oferecer características próprias aos vinhos. Com isso, a Embrapa contribuiu para o aumento de qualidade, tipificação e redução dos riscos próprios da imprevisibilidade dos agentes transformantes aleatórios.

A coleta de leveduras para esta IP foi efetuada de videiras nas safras de 2016, 2017 e 2018. Dessa forma, foram isoladas cerca de 932 linhagens que estão sendo mantidas em suspensão com sacarose e glicerol a -80°C para posterior avaliação com relação à caracterização, identificação taxonômica e disponibilização para os vinicultores da referida IP.

As características dos microrganismos presentes na microflora dessa IP reforçam a necessidade do uso de linhagens selecionadas em processos fermentativos não estéreis, como a elaboração de vinhos. A Tabela 9.1 mostra o perfil das espécies coletadas na IP Vinhos de Altitude de Santa Catarina.

A flora é diversificada, compreendendo 21 espécies e 13 gêneros<sup>1</sup>. Das 932 linhagens isoladas nessa IP, apenas 42 linhagens (4,5%) apresentaram capacidade fermentativa adequada, confirmando dessa forma a baixa frequência de espécies fermentativas nas bagas.

Tabela 9.1. Linhagens caracterizadas e identificadas.

Gênero	Espécie	Número	[F/S]	Nível de H <sub>2</sub> S	Killer
<i>Aureobasidium</i>	<i>pullulans</i>	4	1,33	-	K <sup>2</sup> /N <sup>3</sup> /S <sup>4</sup>
<i>Candida</i>	<i>zymyza</i>	9	3,00	+1/+2	N/S
<i>Candida</i>	<i>californica</i>	2	0,67	-/+3	N/S
<i>Candida</i>	<i>diversa</i>	19	6,33	-/+3/+2/+1	K/N
<i>Candida</i>	<i>parapsilosis</i>	1	0,33	+3	N/S
<i>Filobasidium</i>	<i>magnum</i>	1	0,33	-	N/S
<i>Hanseniaspora</i>	<i>opuntiae</i>	101	33,67	-/+3/+1/+2	N/S
<i>Hanseniaspora</i>	<i>uvarum</i>	410	136,67	-/+2/+3/+1	K/N/S
<i>Issatchenkia</i>	<i>terricola</i>	57	19,0	-/+3/+2	K/N/S
<i>Issatchenkia</i>	<i>hanoiensis</i>	3	1,0	+3	N
<i>Metschnikowia</i>	<i>pulcherrima</i>	2	0,67	+3	N
<i>Papiliotrema</i>	<i>laurentii</i>	1	0,33	+1	N
<i>Pichia</i>	<i>fermentans</i>	2	0,67	+2	N/S
<i>Pichia</i>	<i>occidentalis</i>	16	5,33	+3/+2/+1	K/N/S
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	42	14,0	-/+1/+2	K/N/S
<i>Saccharomycopsis</i>	<i>crataegensis</i>	2	0,67	-	N
<i>Saccharomycopsis</i>	<i>vini</i>	8	2,67	-/+1	K/N
<i>Sporidiobolus</i>	<i>pararoseus</i>	8	2,67	-	N/S
<i>Starmerella</i>	<i>bacillaris</i>	135	45,0	-/+2/+1/+3	K/N/S
<i>Yarrowia</i>	<i>lipolytica</i>	1	0,33	-	N
<i>Zygoascus</i>	<i>meyerae</i>	10	3,33	+2/+1	N/S
<b>Identificadas</b>		<b>834</b>			
<b>Não Identificadas</b>		<b>98</b>			
<b>Total</b>		<b>932</b>			

<sup>1</sup>Frequência/Safra <sup>2</sup>Killer <sup>3</sup>Neutra <sup>4</sup>Sensível <sup>5</sup>Ainda não disponível

<sup>1</sup>Todos os microrganismos estão devidamente cadastrados no SisGen sob N°A603BA9

Das 42 linhagens fermentativas (Tabela 9.1), sete são formadoras de H<sub>2</sub>S e todas apresentaram características killer apenas para linhagens *Saccharomyces cerevisiae*. Esse fato é especialmente significativo para a elaboração de vinhos dessa região porque se uma das linhagens killer e produtora de H<sub>2</sub>S assumir o processo, o vinho poderá ganhar pontos negativos que não se restringem apenas a odores de ovo podre ou esgoto, mas de outros odores menos agressivos, porém igualmente indesejáveis dele derivado, como borracha, borracha queimada, fósforo queimado, alho, cebola, repolho entre outros, embora alguns destes apresentem limiares de percepção mais elevados que aquele exibido pelo H<sub>2</sub>S.

A maior frequência foi obtida com *Hanseniaspora uvarum*, com 136,7 linhagens por safra, seguida da *Hanseniaspora opuntiae* com 33,7 linhagens por safra. Linhagens de *Hanseniaspora uvarum* estão envolvidas com forte produção de ácido acético (APONTE & BLAIOTTA, 2016). A quantidade elevada desta espécie no processo fermentativo pode acarretar aumento na acidez volátil.

A espécie *Hanseniaspora opuntiae*, a segunda com a maior frequência por safra, está envolvida na formação de substâncias que atribuem ao vinho, a nota floral e de doçura.

Surpreendente foi a frequência de *Starmerella bacillaris*, com um número de 45 linhagens isoladas por safra. Nesta espécie há linhagens killers sensíveis e neutras. Foram caracterizadas linhagens dessa espécie sem capacidade de formar H<sub>2</sub>S e linhagens com capacidade de produção variada. Linhagens dessa espécie formam teores significativos de glicerol (APONTE & BLAIOTTA, 2016). Este produto do metabolismo é extremamente importante para o vinho, uma vez que faz parte de seu extrato seco, contribuindo para o aumento de sua qualidade tanto no aspecto sensorial quanto na diminuição da relação entre o etanol e o extrato seco reduzido (álcool em peso/extrato seco reduzido).

Há espécies encontradas com baixa frequência. Um exemplo dessas espécies é de *Metschnikowia pulcherrima*. Esta espécie está relacionada com capacidade de formar quantidades apreciáveis de manoproteínas. Estas conferem propriedades sensoriais interessantes, provocam

o decréscimo da adstringência e da instabilidade proteica e tartárica, promovem o aumento da complexidade, da persistência aromática, da doçura e atuam no processo de arredondamento do vinho. Linhagens dessa espécie serão futuramente estudadas com relação às atividades cinéticas e formação de manoproteínas e oferecidas como agente de incremento de qualidade dos vinhos da referida IP. O inconveniente encontrado na espécie *Metschnikowia pulcherrima* isolada na região da referida IP está relacionado com a capacidade de elevada formação de H<sub>2</sub>S que essas duas linhagens apresentam.

Com relação às linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, verificou-se que, apesar de apresentar uma frequência de 14 por safra (Tabela 9.1), não foram em todos os vinhedos e nem em todas as safras que esta espécie esteve presente. As linhagens isoladas apresentam formação variada de H<sub>2</sub>S, ou seja, algumas não formam e outras chegam a produzir níveis importantes de H<sub>2</sub>S. As produtoras de H<sub>2</sub>S dessa espécie representam 19%. Uma característica dessas linhagens reside no fato de serem todas killer para a linhagem sensível *Saccharomyces cerevisiae* 26B84. Das 42 linhagens isoladas, seis se mostraram sensíveis a uma linhagem killer da espécie *Candida diversa*. Uma delas, além de apresentar sensibilidade à linhagem killer *Candida diversa*, foi também sensível a uma outra linhagem killer da espécie *Hanseniaspora opuntiae*. Com esse resultado, pode-se dizer, com relação à *Saccharomyces cerevisiae*, que nem todas as linhagens presentes nos vinhedos podem ser empregadas no processo de vinificação, que estas linhagens não afetam, sob ponto de vista killer, linhagens não-*Saccharomyces* e que a prática de se realizar uma fermentação espontânea pode acarretar riscos irreversíveis à qualidade do vinho.

Considerando a formação geral de H<sub>2</sub>S, verificou-se que, no universo de 21 espécies isoladas dessa IP, 76,2% delas possuem pelo menos uma linhagem representante no grupo das formadoras de H<sub>2</sub>S. No tocante às características killer, observou-se que, em 28,6% das espécies, houve pelo menos uma linhagem com características killer-neutra-sensível (KNS). Linhagens com característica apenas neutra (N) representam 23,8% das espécies isoladas.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre as 33 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que apresentam potencial de uso em vinificação, em 2018 foi eleita uma linhagem para testes em nível industrial na região da IP Vinhos de Altitude de Santa Catarina. A linhagem IPSC1, a primeira levedura autóctone selecionada pela Embrapa Uva e Vinho para vinificação do estado de Santa Catarina, foi disponibilizada, na forma líquida, para os vinicultores na safra de 2018. Trata-se de uma linhagem com uma velocidade de fermentação elevada, é killer apenas para linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* sensíveis, apresenta aroma intrínseco agradável e não forma  $H_2S$ . Convém salientar que o aroma da levedura depende substancialmente do cultivar de uva empregado na vinificação e dos procedimen-

tos enológicos aplicados. Como salientado anteriormente, há linhagens de levedura com capacidade de, em condições fermentativas, formar concentrações consideráveis de  $H_2S$ . Daí a necessidade de se empregar linhagens adequadas à vinificação, como a IPSC1, com velocidade de fermentação elevada e com deficiência para a produção de  $H_2S$ . Com isso, reduz-se a chance de as linhagens indesejáveis, de velocidade de fermentação mais baixa, atuarem no processo de forma incisiva, uma vez que 66,7% das espécies formam  $H_2S$  em níveis médio (2) e alto (3). Todas as 33 linhagens acham-se na CMIA da Embrapa Uva e Vinho, em Bento Gonçalves, estão mantidas a  $-80^{\circ}C$  e estão disponíveis para vinicultores da IP Vinhos de Altitude de Santa Catarina.





## REFERÊNCIAS

APONTE, M.; BLAIOTTA, G. Potential role of yeast strains isolated from grapes in the production of Taurasi DOCG. *Front Microbiol*, v. 7, p. 1–11, 2016.

BADLER, V. R. The Archeological Evidence for Winemaking, Distribution and Co-sumption at Proto-Historic Godin Tepe Iran. In: McGOVERN, P. E.; FLEMING, S. J.; KATZ, S. H. *The Origins and Ancient History of Wine Food and Nutrition in History and Anthropology*, Routledge, 440p. 1996.

BARNETT, J. A. Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research. *Microbiology*, v. 149, (Pt 3), p. 557–567. 2003.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. *Yeasts: Characteristics and identification*. Cambridge University Press, Cambridge, second edition, 811p., 1990.

CORDENTE, A. G.; CURTIN, C. D.; VARELA, C.; PRETORIUS, I. S. Flavour-active wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 96, n. 3, 601. 2012.

GRIVETTI, L. E. Wine: The Food with Two Faces. In: *The Origins and Ancient History of Wine Food and Nutrition in History and Anthropology*, Routledge, 440p. 1996.

INNIS, M. A.; GELFAND, D. H. *Optimization of PCRs.*, chapter 1, pages 3–12. Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Academic Press, Limited, 24–28 Oval Road, London NW1 7DX. 1990.

KIRSOP, B. E. Maintenance of yeasts. In: Kirsop, B. E. and Snell, J. J., editors, *Maintenance of Microorganisms: A Manual of Laboratory Methods*, chapter 12, pages 109–130. Harcourt Brace Jovanovich, 24/28 Oval Road, London NW1 7DX. 1984.

LILLY, M.; BAUER, F. F.; LAMBRECHTS, M. G.; SWIEGERS, J. H.; COZZOLINO, D.; PRETORIUS, I. S. The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast*, v. 23, n. 9, p. 641–659. 2006

McGOVERN, P. E.; HARTUNG, U.; BADLER, V. R.; GLUSKER, D. L.; EXNER, L. J. The beginnings of winemaking and viticulture in the ancient Near East and Egypt. *Expedition*, v. 39, p. 3–21. 1997.

McGOVERN, P. E.; ZHANG, J.; TANG, J.; ZHANG, Z.; HALL, G. R.; MOREAU, R. A.; NUÑEZ, A.; BUTRYM, E. D.; RICHARDS, M. P.; WANG, C. S.; CHENG, G.; ZHAO, Z.; AND WANG, C. Fermented beverages of pre-and proto-historic China. *Proc Natl Acad Sci U SA*, 101(51):17593–17598. (2004).

MORENO-ARRIBAS, M.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. Evolution of red wine anthocyanins during malolactic fermentation, post fermentative treatments and ageing with lees. *Food Chemistry*, v. 109, p. 149–158, 2008.

MORTIMER, R.; POLSINELLI, M. On the origins of wine yeast. *Res Microbiol*, v. 150, n. 3, p. 199–204, 1999.

PRETORIUS, I. Conducting wine symphonics with the aid of yeast genomics. *Beverages*, v. 2, n. 4, 36. 2016.

SINGLETON, V. L. An Enologist's Commentary on Ancient Wines. In: McGOVERN, P. E.; FLEMING, S. J.; KATZ, S. H. *The Origins and Ancient History of Wine Food and Nutrition in History and Anthropology*, Routledge, 440p. 1996.

VALLEE, B. L. Alcohol in the western world. *Scientific American*, v. 278, n. 6, p. 80–85. 1998.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *J Ind Microbiol*, v. 14, n. 6, p. 514–522, 1995.

VILANOVA, M.; CAMPO, E.; ESCUDERO, A.; GRAÑA, M.; MASA, A.; CACHO, J. Volatile composition and sensory properties of *Vitis vinifera* red cultivars from north west Spain: correlation between sensory and instrumental analysis. *Anal Chim Acta*, n. 720, p. 104–111. 2012.