



**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

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 amigas 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 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. A fermentação espontânea também foi realizada para a produção da bebida. Os parâmetros fermentativos das leveduras foram semelhantes durante a produção dos vinhos. Trinta e quatro compostos voláteis foram identificados, sendo que os vinhos 3 e 8 apresentaram 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, 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. Besides that, the spontaneous fermentation was also used in beverage production. Furthermore, fermentation parameters of yeasts were similar during the winemaking. From 34 volatile organic compounds identified, samples of wine 3 and 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 typicality 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.....	11
Objetivo geral.....	11
Objetivos específicos.....	11
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1.1 Principais características e identificação de leveduras.....	12
1.2 Leveduras Vínicas.....	14
1.3 Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> vínicas.....	17
1.4 Produção do gás Sulfeto de hidrogênio (H ₂ S).....	18
1.5 Vinho.....	19
1.6 Vale do Submédio do Rio São Francisco.....	22
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
2.1 Obtenção dos micro-organismos.....	27
2.2 Isolamento das leveduras.....	27
2.3 Identificação convencional e molecular das leveduras.....	28
2.3.1 Caracterização molecular das <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
2.3.2 Caracterização molecular das leveduras não- <i>Saccharomyces</i>	30
2.4 Seleção das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> não produtoras do gás Sulfeto de hidrogênio (H ₂ S).....	33
2.5 Microfermentações com as diferentes linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
2.5.1 Micro-organismos utilizados.....	33
2.5.2 Mosto sintético de fermentação.....	34
2.5.3 Condições da Fermentação.....	34
2.5.4 Determinação dos compostos secundários e açúcares por HPLC.....	35
2.6 Produção dos vinhos em pequena escala.....	35
2.6.1 Procedimentos laboratoriais para a produção dos vinhos.....	35
2.6.2 Análise da presença dos fenólicos totais dos vinhos.....	36
2.6.3 Determinação dos compostos secundários e açúcares por HPLC.....	37
2.6.4 Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS).....	37
2.7 Análise estatística.....	38
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
3.1 Identificação convencional e molecular das leveduras.....	39

3.1.1 Caracterização molecular das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
3.1.2 Identificação das espécies de leveduras não- <i>Saccharomyces</i>	50
3.2 Seleção das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> não produtoras do gás Sulfeto de hidrogênio (H ₂ S).....	55
3.3 Microfermentações das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	56
3.4 Produção dos vinhos em pequena escala.....	62
3.4.1 Análise da presença dos fenólicos totais dos vinhos.....	62
3.4.2 Consumo de açúcares e produção de etanol, glicerol e ácido acético.....	63
3.4.3 Determinação dos compostos voláteis nos vinhos.....	65
4. CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

INTRODUÇÃO GERAL

A seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* indígenas para a produção de vinhos típicos de uma região é realizado 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 no Vale do São Francisco 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 alcoólica, quebrando os açúcares presentes em etanol, CO₂ e nos 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, possuir um rápido início no processo fermentativo, resistente ao etanol, entre outras. Quando a levedura é selecionada da própria região, essa já está adaptada àquele ambiente de vinícola, podendo facilitar a introdução dessas linhagens no processo fermentativo.

As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* indígenas podem ser diferenciadas pela análise de restrição do DNA mitocondrial, utilizando 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* da própria uva (*Vitis vinifera*) de linhagens comerciais utilizadas na produção de vinhos. Os vinhos produzidos no Vale do São Francisco são fabricados utilizando linhagens comerciais de origem européia ou australiana. Até o momento, não existe nenhuma linhagem regional de *S. cerevisiae* selecionada para a produção de vinhos no Vale do São Francisco.

Vinhos com características próprias da região do Vale do São Francisco poderão ter um maior valor de mercado. No entanto, para isso, esse produto precisa apresentar qualidades que o tornem competitivo no mercado de vinhos, como ocorre em países de grande tradição vinícola, que possuem produtos exclusivos de cada região. O presente trabalho tem como objetivo principal estudar o potencial de linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de uvas do Vale do São Francisco para a produção de vinhos. Essas linhagens poderão no futuro contribuir com as características organolépticas que darão tipicidade aos vinhos da região.

OBJETIVOS

1 Objetivo geral

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

2 Objetivos específicos

- Isolar as leveduras indígenas a partir do mosto fermentado de uva (*Vitis vinifera* L.) 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 das uvas (*Vitis vinifera* L.), por meio de testes fisiológicos e moleculares;
- Caracterizar molecularmente pela análise de restrição do DNA mitocondrial as linhagens de *S. cerevisiae* isoladas a partir do mosto fermentado de uvas (*V. vinifera* L.);
- Caracterizar os isolados de *S. cerevisiae* quanto à produção do gás H₂S;
- Realizar microfermentações com as linhagens indígenas de *S. cerevisiae* em mosto sintético;
- Determinar os compostos secundários e açúcares presentes nas microfermentações;
- Produzir vinhos em pequena escala utilizando as linhagens indígenas diferentes de *S. cerevisiae* selecionadas;
- Determinar os compostos secundários presentes nos vinhos produzidos pelas linhagens indígenas selecionadas de *S. cerevisiae*;
- Selecionar as linhagens indígenas de *S. cerevisiae* produtoras de aromas frutados e florais.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Principais características e identificação de leveduras

Leveduras são micro-organismos eucariontes pertencentes ao Reino Fungi e presentes nos Filos dos Ascomycotas (grande maioria) e Basidiomycotas. As leveduras são fungos unicelulares, não-filamentosos, ovais ou esféricos, podendo se reproduzir sexuadamente (sem apresentar um corpo de frutificação) ou assexuadamente por brotamento ou fissão binária. As regras taxonômicas das leveduras e outros fungos estão de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura de Planta e Fungos (KURTZMAN et al., 2011). De acordo com Kurtzman et al. (2011) existem 1.500 espécies de leveduras pertencentes a 87 gêneros de Ascomycetes e 62 gêneros de Basidiomycetes.

As leveduras são capazes de crescimento anaeróbico facultativo, podendo utilizar oxigênio ou um composto orgânico como aceptor final de elétrons. Essa é uma característica muito importante na permanência desses micro-organismos em diversos ambientes, por exemplo, nas superfícies das plantas, folhas, frutos, néctares das flores, em casca de árvores, no solo e em relação 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 a o melhoramento ou a deterioração dos alimentos açucarados. Dados históricos comprovam o uso das leveduras desde a Antiguidade, como na produção de cerveja em 7000 anos a.C. na Suméria, na produção de vinho na Assíria em 3500 anos a.C. e entre os romanos que possuíam mais de 250 padarias produtoras de fermento em 100 anos a.C. Esses micro-organismos apresentam uma grande diversidade de espécies com propriedades fisiológicas diferentes e são utilizadas em vários processos industriais (KURTZMAN; FELL, 1998; KURTZMAN et al., 2011).

Tradicionalmente, a identificação das 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, levando a uma identificação demorada e onerosa, e nem sempre se consegue chegar a nível de espécie. Na identificação utilizando testes fenotípicos, a reprodutibilidade pode ser questionável, já que muitas vezes depende do estado fisiológico das células e muitas vezes não tem paralelo com aquelas 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 (rRNA). O gene do rRNA nos eucariotos está presente repetidas vezes e cada unidade consiste de regiões codificadas para os genes rRNA 18S, 5.8S e 26S, e dois espaçadores transcritos internos – *Internal Transcribed Spacers* (ITS 1 e ITS 2) - que separam essas regiões. Cada unidade do rRNA é separada por um espaçador intergênico – *Inter Genetic Spacers* (IGS). A unidade do gene do rRNA apresenta componentes em sua sequência que envolve variações e podem ser usadas em estudos de sistemática para diferentes níveis taxonômicos (KURTZMAN; FELL, 2006).

A grande disponibilidade de sequências em bancos de dados de DNA, principalmente para a região D1/D2 da subunidade maior do gene 26S do rRNA, 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 da biologia molecular para diferenciar linhagens diferentes de vinho de *Saccharomyces cerevisiae* é a restrição do DNA mitocondrial (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*) do DNA mitocondrial. Esta técnica consiste em utilizar enzimas de restrição (endonucleases) que irão cortar o DNA em locais específicos e irão formar perfis (fragmentos) de bandas distintas para cada linhagem de *S. cerevisiae*. De acordo com Guillamón et al. (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 quando o DNA genômico é cortado por enzimas de restrição (ricas em GC) o DNA nuclear será quebrado completamente, pois apresenta uma alta proporção de sítios GC que serão clivados pelas enzimas de restrição. Entretanto, o DNA mitocondrial que possui um pequeno número de sítios de restrição para as bases GC, portanto será clivado em fragmentos longos de vários tamanhos, possibilitando a visualização de polimorfismos intraespecíficos das *S. cerevisiae* sem precisar isolar o DNA mitocondrial (QUEROL et al., 1992a).

O DNA mitocondrial das *S. cerevisiae* é pequeno, podendo possuir de 60 a 80kb, 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* de vinho

(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, estes estudos mostraram uma grande diversidade de linhagens de *S. cerevisiae* associada com processos de fermentação espontânea na produção de vinhos e outras bebidas. Esta técnica também permite acompanhar 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 na conversão do mosto de uva para o vinho é um processo bioquímico complexo que envolve as 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 são isoladas facilmente na natureza e encontradas nos solos, na superfície de produtos hortícolas e no trato digestivo dos animais, sendo distribuídas pela natureza com a ajuda dos insetos e pelo vento (KURTZMAN et al., 2011); na superfície da videira são distribuídas irregularmente, sendo encontradas em pequenas quantidades nas folhas, caule e uvas verdes, colonizando a pele da uva durante a maturação. Por meio de observações utilizando microscópio eletrônico de varredura foi possível visualizar a presença de leveduras nas 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 um dos fatores o aumento da concentração do açúcar presente. No entanto, quanto mais as uvas são tratadas com inseticidas e fungicidas a microbiota indígena diminui (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 desenvolvendo uma comunidade residente (ROSINI, 1984; FLEET; HEARD, 1993; MARTINI et al., 1996; CONSTANTÍ et al., 1997; MORTIMER; POLSINELLI, 1999). De acordo com Pretorius (2000), a origem das leveduras do vinhedo ou da adega depende de diversos fatores como: condições climáticas (temperatura e pluviosidade), a localização geográfica da vinha, a quantidade de SO₂ utilizado, 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 do mosto da uva, uma variedade de espécies de leveduras dos gêneros *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), *Pichia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Issatchenkia*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Meyerozyma*, *Wickerhamomyces*, *Torulaspota*, *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; WANGA; LIU, 2013; PÉREZ-MARTÍN et al., 2014; PONZZES-GOMES et al., 2014; SUN et al., 2014; SUN; LIU, 2014). Normalmente, estas leveduras são consideradas como transitórias durante o processo de fermentação.

Na superfície das uvas, o número de espécies de levedura é limitado, estando presentes espécies de metabolismo oxidativo do gênero *Rhodotorula* e algumas sensíveis ao álcool, sendo a mais comum a levedura apiculada *Kloeckera apiculata* (= *Hanseniaspora uvarum*). Essa espécie compreende até 99% dos isolados das 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 uniguttulatum*, *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 do meio ao fim do processo fermentativo. Nas primeiras 20 horas, os números populacionais de *S. cerevisiae* estão

próximos das demais espécies. No entanto, depois de 3 a 4 dias de fermentação *S. cerevisiae* predomina, sendo 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 vêm isolando e identificando leveduras indígenas dos vinhos ou das uvas para a melhoria e conhecimento das suas propriedades de vinificações. Sun et al. (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 et al. (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 (Itália). A partir de total de 160 isolados caracterizados pela amplificação por PCR da região inter-delta, seis linhagens diferentes foram encontrados. Linhagens representativas dos seis perfis encontrados foram utilizadas para a produção de vinhos.

Settanni et al. (2012) estudaram a ecologia das leveduras associadas com a fermentação espontânea dos vinhos da variedade “Grillo” na cidade de Sicília (Itália). As leveduras foram identificadas por meio da análise em RFLP do gene do rRNA 5.8S e 26S rRNA e, sequenciamento do domínio D1/D2 do gene 26S do rRNA. Os autores encontraram 14 espécies pertencentes 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 nos mostos das uvas, e três destas foram consideradas apropriadas para a utilização na produção de vinhos. Liang et al. (2013) estudaram a melhoria da qualidade e aroma dos 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. Dados

como os citados acima corroboram a importância do isolamento de linhagens indígenas regionais para a produção de vinhos.

1.3 Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* vnicas

As linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas em vinificação são principalmente diplóides, aneuplóides ou até poliplóides. Os estados aneuplóides e poliplóides das *S. cerevisiae* conferem vantagens as mesmas como a adaptação as mudanças ambientais e o aumento da quantidade 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).

Essa espécie de levedura é capaz de transformar 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 esta 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 seja elevado. Esse é um fenômeno conhecido como repressão catabólica ou o efeito de 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 as 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 et al., 2013; SUN et al., 2014; TOFALOET al., 2014). Essas linhagens indígenas mostram maior adaptação ao meio e às condições particulares de fermentação, suportando os estresses presentes (temperatura, alta concentração de etanol, esgotamento do 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 apresenta algumas vantagens que favorecem o início mais rápido do processo, diminui os 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 estas precisam apresentar algumas características fermentativas importantes como: rápido início do processo fermentativo; 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); produzir quantidades adequadas de glicerol; 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 altas concentrações para que consigam se sobrepor às demais presentes da microbiota indígena e assim conseguem 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 destas espécies transientes podem também contribuir para a qualidade da bebida no final da fermentação como por exemplo em casos de fermentações realizadas em temperaturas baixas, fazendo com que a intolerância ao etanol por elas seja menor. Fermentações em temperaturas menores que 15-20°C fazem com que espécies de *Hanseniaspora* e *Candida* apresentem uma grande contribuição e um impacto maior no sabor do vinho. Nessas condições, essas espécies podem se comportar semelhantes a *S. cerevisiae* e outras espécies predominantes no final da fermentação (ERTEN, 2002; MILLS et al., 2002).

1.4 Produção do gás Sulfeto de hidrogênio (H₂S)

Dentre as características já citadas acima que uma levedura iniciadora precisa possuir, a produção elevada do composto volátil H₂S é prejudicial à qualidade do vinho, pois ao ser formado durante a fermentação esse gás produz um aroma característico de ovo podre e putrefação. Além de ser altamente reativo, funciona como um precursor para o

desenvolvimento de outros compostos de 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, esta 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).

Há diversas formas que pode influenciar na produção do gás H₂S, como a deficiência de nitrogênio no mosto de fermentação. 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, então o ajuste dos níveis iniciais é de grande importância quando se quer produzir um vinho com aromas de qualidade (BISSON, 1991; BELL; HENSCHKE, 2005; MENDES-FERREIRA et al., 2009). Dentre outras causas que aumentam a produção desse gás está também a degradação da cisteína em sulfureto pela cisteína desulfidrase (TOKUYAMA et al., 1973; VOS; GRAY, 1979; STRATFORD; ROSE, 1985; RAUHUT, 1993; GUIDICI; KUNKEE, 1994; JIRANEK et al., 1995a; BELOQUI, 1998).

1.5 Vinho

De acordo com a legislação Brasileira (BRASIL, 2004) e a do MERCOSUL (seguida pelo Brasil), 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). 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 frisante, 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 (três) 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).

O “flavour” é provavelmente o fator mais importante que contribui para a 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 surge 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 destes, 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). No entanto, quando presentes em concentrações excessivas, esses compostos podem também ser considerados indesejáveis.

Uma forma de separar, identificar e quantificar esses compostos voláteis do vinho é pela Cromatografia Gasosa (GC) acoplada com a Espectrometria de Massas (MS), antecedida por uma extração, que pode ser realizada pela Microextração em Fase Sólida (SPME). 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 nos 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 de elaboração dos mesmos que é diferente. O primeiro é processado com a casca e o segundo não, sendo um dos fatores que aumenta essa concentração fenólica a duração da maceração com a casca (RIBÉREAU-GAYON et al., 2000).

Os compostos fenólicos se dividem 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, 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, presentes também em seus derivados como suco e vinho. O vinho contém mais de 500 compostos fenólicos, alguns provenientes da uva e outros resultantes da ação das leveduras durante o processo de fermentação do mosto. A maioria destes compostos ocorre em baixas concentrações ($\mu\text{g/mL}$), raramente em concentrações acima de 100mg/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 de fatores como a temperatura, a mistura, os parâmetros da cuba de fermentação, a duração da maceração com a casca, a concentração de etanol, SO₂, a linhagem de levedura, pH e enzimas pectolíticas (STRATIL, et al., 2008).

A capacidade antioxidante de 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 destas substâncias não implica necessariamente atividade antioxidante mais elevada. O que irá determinar a atividade antioxidante será a concentração de cada composto fenólico presente, sendo que flavonóides, proantocianidinas (taninos condensados) e 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, tendo a capacidade quelante de metais com característica catalítica, assim 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 é a 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 1), destacando-se 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 uva e vinho. Essa atividade vem sendo desenvolvida desde os anos de 1980, apresentando um clima semiárido (TONIETTO; TEIXEIRA, 2004). A cultura da uva (*Vitis vinifera* L.), utilizada nos processos de produção dos vinhos do Nordeste brasileiro no Submédio do Rio São Francisco, vem se desenvolvendo rapidamente por vários motivos, dentre estes, 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-lhe 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.

Responsável por 99% da uva de mesa exportada pelo Brasil e pela produção de 7 milhões de litros de vinho por ano, esta região vem se tornando um modelo de desenvolvimento para o Nordeste. No Brasil, cerca de 85% do total de vinhos produzidos são das uvas da variedade *Vitis labrusca*, que corresponde a 300 milhões de litros por ano, e apenas 15% das uvas da variedade *Vitis vinifera* L., correspondendo a 40 milhões de litros por ano (PEREIRA et al., 2011).

A vinicultura pernambucana/baiana já detém 15% do mercado nacional e emprega diretamente 30 mil pessoas. Esta região é caracterizada por ser a única no mundo que produz duas safras e meia por ano (PEREIRA et al., 2011; CODEVASF, 2014). Entretanto, as regiões tradicionais na produção de vinho (Europa, América do Sul e do Norte, África do Sul e Oceania) são situadas em zonas de clima temperado e por causa das baixas temperaturas no inverno apenas uma colheita por ano é obtida (REYNIER, 2003).

As uvas da região Submédio do Rio São Francisco são as únicas cultivadas entre os paralelos 8º e 9º 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, assim reduzindo o problema de doenças fitossanitárias, em especial as fúngicas (TAVARES et al., 2004).



Figura 1: Bacia do Rio São Francisco e suas subdivisões por região.

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

Esta localidade 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, a 330 m de altitude. Além das vantagens 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 possibilita escolher os 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 com que as videiras se desenvolvam o ano todo, possibilitando decidir quando 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 um Laboratório de Enologia com tecnologia para ser um dos mais modernos do

País (CODESVASF, 2014). O principal objetivo foi empreender análises dos vinhos da região com monitoramento da qualidade e certificação da procedência do que é produzido no Vale do São Francisco. O investimento inicial da FINEP e Embrapa foi de R\$1,4 milhão. No mesmo ano, foi assinado 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, 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* da marca Maurivin, AWRI 796; *S. cerevisiae bayanus* da marca Lalvin R2; *S. cerevisiae* (var. *bayanus*) da marca Mycoferm Crio SP; *S. cerevisiae* (var. *bayanus*) da marca Maurivin PDM; *S. cerevisiae* (var. *bayanus*) da marca Mycoferm Cru 05; *S. cerevisiae* da marca Fermol Rouge (AEB). As principais características destas linhagens de leveduras são descritas abaixo. AWRI 796 é uma levedura da marca Australiana Maurivin, sendo o primeiro isolado de *S. cerevisiae* fornecido 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, onde o enologista deseja pouca ou nenhuma interferência a partir da linhagem de levedura sobre o carácter 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* seca ativa que produz moderada a baixos níveis de compostos de aroma e sabor ao 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* seca ativa que foi isolada em Sauternes, região de Bordeaux (França). Tem excelentes propriedades em temperatura fria, sendo utilizada para fermentar em temperaturas baixas, como 5°C. Lalvin R2 ajuda a produzir intensos vinhos brancos pela 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* seca ativa 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

particularmente fermentação de mostos em baixa temperatura (a partir de 9 ° C). Seu valor comercializado é de \$51,65 (500g) (ENOLTECH, 2015).

Mycoferm Cru 05 é uma *S. cerevisiae* seca ativa 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 a 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 comercializado é de \$51,65 (500g) (ENOLTECH, 2015).

Fermol Rouge é uma *S. cerevisiae* seca ativa selecionada em mosto obtidas de uvas tintas. É indicada para fermentações com altas concentrações de açúcar, para fermentações em tinto, possui um espectro de temperatura de fermentação de 10 a 32°C, baixa formação de espuma. Com esta levedura obtêm-se vinhos finos que refletem as características varietais aumentando as notas de aromas de frutos vermelhos. Seu valor comercializado 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.

2.2 Isolamento das leveduras

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). As variedades de uvas amostradas foram: Syrah, Tempranillo, Petit Verdot, Cabernet Sauvignon e Chenin blanc. A variedade Syrah foi colhida nas fazendas Ouro Verde/Miolo, Ducos Vinícola e Vinibrasil/Rio Sol; a variedade Tempranillo na fazenda Vinibrasil/Rio Sol; 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 aproximadamente entre os pontos de 80 a 100 m. Cerca de 1 a 2 kg de uvas foram assepticamente coletados em sacos plásticos estéreis, transportados refrigerados 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 estéreis da coleta para extração do suco, sendo 500 mL transferidos para frascos estéreis para iniciar o processo de fermentação espontânea, 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, ficou estável foi o momento para o isolamento das leveduras.

Para os isolamentos foram preparadas diluições decimais de cada amostra. O inóculo de cada diluição foi realizado em triplicata, utilizando 0,1 mL de suspensão, de diluições decimais apropriadas (10^{-4} e 10^{-6}). O meio utilizado para isolamento das leveduras foi o agar YM (“yeast extract-malt extract agar”, glicose 1%, extrato de malte 0,3%, extrato de levedura 0,3%, peptona 0,5% e agar 2%, acrescidos de 0,001% de cloranfenicol). O agar YCB (Yeast Carbon Base 1,17%, agar 2%, acrescido de lisina 0,056% com 0,001% de cloranfenicol) foi

utilizado para o isolamento de leveduras não-*Saccharomyces*, sendo empregado, em triplicata, as diluições de 10^{-2} e 10^{-4} . As placas foram incubadas a 25°C por três a sete dias. Após esse período, foram purificados 5 isolados das placas de maior diluição (com a presença de 30 a 300 colônias) do morfotipo dominante e, um exemplar de cada morfotipo diferente, nas placas de agar YM e nas placas de YCB lisina para posterior identificação. Todos os isolados foram preservados por congelamento em ultrafreezer a -80 °C.

2.3 Identificação convencional e molecular das leveduras

As análises das características macromorfológicas como tamanho, forma, elevação, borda, cor, textura foram observadas após o crescimento colonial dos morfotipos isolados. Logo a seguir, os isolados foram testados em relação à capacidade de fermentar e assimilar diferentes fontes de carbono, e termotolerância (KURTZMAN et al., 2011). Esse procedimento foi realizado para que as leveduras de um mesmo perfil fisiológico fossem agrupadas para os estudos moleculares.

2.3.1 Caracterização molecular das *Saccharomyces cerevisiae*

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

Obtenção do DNA total

Para a extração de DNA total, as leveduras foram reativadas em meio ágar YM (1% de glicose; 0,5% de peptona bacteriológica; 0,3% de extrato de levedura; 0,3% de extrato de malte; 2% de ágar) por 24 a 48 h a 25°C. Posteriormente, os isolados foram crescidos 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 a temperatura ambiente e, em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células, para serem lavadas, foram ressuspensas em 1 mL de água destilada estéril e centrifugadas novamente a 12.000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensado em 500 µL de Solução I (0,9M de Sorbitol e 0,1M de EDTA) e adicionado 30

μL da enzima lítica Zimoliasa 20T (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dissolvida em Solução I), homogeneizado no vortex, e incubado a 37°C por 30 minutos para a liberação dos protoplastos.

Passado o tempo de incubação as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente, em seguida, foi descartado o sobrenadante. O sedimento foi ressuspenso, suavemente com a ajuda de uma ponteira, em 500 μL de Solução II (Tris-HCl 50 mM e EDTA 20 mM pH 7,4) e adicionado 13 μL de SDS 10%, homogeneizado por inversão e incubado a 65°C por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se às amostras 200 μL de acetato de potássio 3 M e foram colocadas no 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 estéril, adicionado 700 μL de isopropanol, homogeneizado suavemente por inversão e colocado por 10 minutos a temperatura ambiente. Após essa incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado cuidadosamente, acrescentado 500 μL de etanol 70% ao DNA para ser lavado, e centrifugado por 5 minutos a 12.000 rpm. Após a lavagem, o sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o DNA foi deixado, por 10 minutos, invertido sobre um papel toalha para todo o etanol ser evaporado e após colocado numa estufa a 37°C por 30 minutos para o etanol restante ser eliminado. Quando todo o etanol foi evaporado do DNA, a reidratação foi realizada com 20 μL de água de injeção estéril, e esse foi guardado 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 estéril, 3,0 μL de tampão 10x da enzima *Hinf I*, 1,5 μL de RNase (Invitrogen, 20mg/mL), 1,5 μL da enzima de restrição *Hinf I* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), incubada à temperatura de 37°C “over-night”. Os produtos da digestão (acrescidos de Gelred com tampão de corrida 6x) foram separados e analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (80 V por 150 minutos) em TBE 0,5X. Os perfis de restrição do DNA mitocondrial gerados foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados utilizando sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat, França).

Com o objetivo de constatar se as linhagens encontradas no presente estudo eram realmente indígenas ou não, foram realizadas comparações com as seis linhagens comerciais de *S. cerevisiae* mais utilizadas na região do Vale do São Francisco. As linhagens comerciais foram: *S. cerevisiae* da marca Maurivin, AWRI 796, nomeada neste trabalho de C1; *S. cerevisiae bayanus* da marca Lalvin R2 (C2); *S. cerevisiae* (var. *bayanus*) da marca Mycoferm Crio SP (C3); *S. cerevisiae* (var. *bayanus*) da marca Maurivin PDM (C4); *S. cerevisiae* da marca Mycoferm (C5); *S. cerevisiae* da marca Fermol Rouge (C6).

2.3.2 Caracterização molecular das leveduras não-*Saccharomyces*

Extração do DNA Nuclear

Os isolados de não-*Saccharomyces* agrupados pela caracterização morfo-fisiológica foram crescidas em meio ágar YM (1% de glicose; 0,5% de peptona bacteriológica; 0,3% de extrato de levedura; 0,3% de extrato de malte; 2% de ágar) por 24-48h à 25°C. Após crescimento, foram ressuspendidas em 100 µL de tampão de lise (1M Tris-HCl, 0,5 M EDTA, 5M NaCl, 10% SDS e água destilada) e incubadas a 65°C por no mínimo 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), homogeneizados gentilmente, por inversão, e centrifugados por 15 minutos a 14.000 rpm. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido com o auxílio da pipeta para um novo microtubo, adicionado v/v de isopropanol na temperatura ambiente e colocado por 15 minutos, na bancada, para o DNA precipitar. Uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos foi então realizada, após isso, o sobrenadante foi descartado por inversão. Foi adicionado 200 µL de etanol 70% gelado, homogeneizado por inversão e centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado por inversão. Após essa etapa, o DNA foi deixado a temperatura ambiente *overnight* para evaporação de todo o etanol. No dia seguinte, o DNA foi reidratado adicionando 50 µL de TE pH 8 e, posteriormente, quantificado em aparelho de NanoDrop (NanoDrop Technologies). O material foi estocado no freezer a -20°C até sua utilização.

PCR utilizando Intron Splice Site primer E11

Após a extração do DNA nuclear foram realizadas as reações de PCR utilizando o iniciador *Intron Splice Site* E11 (5'CTGGCTTGGTGTATGT), descrito por Barros Lopes et al. (1996), utilizando o termociclador Mastercycler (Eppendorf). 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 MgCl_2 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 de injeção estéril q.s.p. suficiente para completar o volume final. O programa de ciclagem consistiu inicialmente da desnaturação do DNA a $94 \text{ }^\circ\text{C}$ por 3 minutos e, em seguida, submetida a 33 ciclos de desnaturação a $94 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 minuto, 33 ciclos de anelamento a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 minutos e 33 ciclos de polimerização a $74 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1,30 minuto, e com uma extensão final a $74 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 minutos. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% por 90 minutos a 80 V em tampão TBE 0,5X. Os perfis de banda foram visualizados com auxílio de luz ultravioleta e fotografados utilizando um sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat). Com a visualização 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 grupo baseado no perfil molecular obtido com o iniciador EI1 teve a região ITS1 e os domínios D1/D2 da subunidade maior do rDNA sequenciada. Para a reação de PCR, foram utilizados os iniciadores ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTTGCGG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), segundo Lachance et al. (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 MgCl_2 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 estéril q.s.p. suficiente para completar o volume final. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o termociclador Mastercycler (Eppendorf). O programa de ciclagem teve uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 95°C , 35 ciclos de 25 segundos de anelamento do iniciador a 54°C e 20 segundos de 35 ciclos de extensão a 72°C , e uma extensão final por 10 minutos a 72°C . Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. Os perfis de banda foram visualizados com auxílio de luz ultravioleta e fotografados utilizando um sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat).

Os produtos de PCR foram purificados da seguinte forma: foi adicionado ao produto (47 μL) de PCR (amplicon) um volume de 11,75 μL de EDTA 125mM e 141 μL de etanol

absoluto. Foi homogeneizado por inversão e deixado na bancada por 15 minutos para precipitação do DNA. Após esse tempo, o DNA foi centrifugado a 14.000 rpm por 25 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado, sendo adicionado 120 µL de etanol 70% para lavar o sedimento, homogeneizado por inversão, e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Logo após, o sobrenadante foi descartado e o DNA foi deixado a temperatura ambiente “overnight” para evaporação de todo o excesso de etanol. O DNA foi ressuspensionado com a adição de 10 µL de água de injeção estéril 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 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) preparada para um volume final de 10 µL, em que foram colocados: 1 µL do iniciador 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 contenha entre 15 e 20 ng) e o restante de água para injeção esterilizada para completar o volume, se necessário. O programa de ciclagem utilizado consistiu de uma desnaturação inicial a 36°C por 1 minuto, 36 ciclos de anelamento a 96°C por 15 segundos, seguido por 15 segundos de extensão a 50°C e 4 minutos de extensão final a 60°C.

Os produtos do sequenciamento 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 a temperatura ambiente, protegida da luz (escuro). Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 3.700 r.p.m a temperatura ambiente e o sobrenadante descartado por inversão. Em seguida, foram acrescentados 100 µL de etanol 70% (Merck) e as amostras novamente centrifugadas por 15 minutos a 3.700 r.p.m a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado por inversão e em cada poço foi acrescentado 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 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 Biothecnology (Altschul et al., 1997). As sequências obtidas foram comparadas com as já depositadas no GenBank, e as sequências similares foram alinhadas usando o programa CLUSTALW software package (EMBL-EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Para ser considerada pertencente a uma espécie conhecida, o isolado apresentou similaridade na sequência analisada de 99% ou mais em relação à outra já depositada no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>).

2.4 Seleção das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* não produtoras do gás Sulfeto de hidrogênio (H₂S)

Para testar se as linhagens de *S. cerevisiae* produziam ou não o gás Sulfeto de hidrogênio (H₂S) foi utilizado o meio diferencial Bacto Bismuth Sulfite Ágar (BSA), de acordo com a metodologia descrita por Zambonelli (1964 a, b), e Jiranek et al. (1995b). Para visualizar a produção ou não desse gás, as colônias foram incubadas no meio BSA por 3 dias a 30°C. As colônias produtoras do H₂S apresentaram uma coloração escura (marrom ou negra), devido à reação desse composto com o sulfeto ferroso presente no meio, formando assim o sal negro sulfeto de ferro. As leveduras não produtoras do H₂S apresentam colônias brancas.

2.5 Microfermentações com as diferentes linhagens de *S. cerevisiae*

2.5.1 Micro-organismos utilizados

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

2.5.2 Mosto sintético de fermentação

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

- 200g/L de **açúcar** (100g/L de glicose e 100g/L de frutose);

- 6g/L de **ácido cítrico**;
- 6g/L de **DL-ácido málico**;
- **Sais minerais** (750 mg/L de KH_2PO_4 , 500 mg/L de K_2SO_4 , 250 mg/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 155 mg/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 200 mg/L de NaCl , 4 mg/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 4 mg/L de ZnSO_4 , 1 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 mg/L de KI , 0,4 mg/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mg/L de H_3BO_3 , 1 mg/L de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$);
- **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).

2.5.3 Condições da 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) do inóculo e calculado o volume de cada isolado (10^6 células/mL) para ser inoculado numa DO inicial de 0,5 (600nm) no mosto sintético de fermentação com volume final de 1,8 mL. Antes da inoculação de cada isolado no mosto sintético, as células das leveduras foram lavadas com água estéril, centrifugadas, descartado o sobrenadante e ressuspendidas com 0,8 mL do mosto sintético para serem completadas com o volume de 1mL do mesmo mosto e assim atingir o volume final (1,8mL).

As fermentações foram realizadas numa microplaca estéril com volume útil de 2mL e contendo em cada poço 1,8mL do mosto sintético. A microplaca foi levada ao shaker com agitação de 100 rpm a 28°C. Após 48h de fermentação, para cada amostra foi dosada, utilizando-se um aparelho Tecan (Infinite M200), a DO. Os valores de Açúcar Redutor Total (ART) foram determinados pelo método do ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS) preconizado por Miller (1959), no comprimento de onda de 540 nm. Quando o ART atingiu < 2 g/L, o volume

restante do mosto de fermentação foi retirado e centrifugado (14.000 rpm por 15 minutos) para guardar o sobrenadante e descartar as células contidas no mosto. O sobrenadante foi armazenado a -20°C e depois avaliado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-CLAE- (High Performance Liquid Chromatography- HPLC) para determinar a concentração de etanol, glicerol, ácido acético, D-ácido láctico, e o consumo de glicose e frutose.

2.5.4 Determinação dos compostos secundários e açúcares por HPLC

As dosagens dos açúcares (glicose e frutose), ácido acético, etanol e glicerol de cada mosto fermentado por cada linhagem de levedura foram determinadas por HPLC (modelo Prominence Model LC-20A - Shimadzu), a coluna SUPELCOGEL C-610H 30 cm x 7,8 mm (Sigma–Aldrich) e detector índice de refração (RID) RID-10A. A separação ocorreu a 65°C e foi usada como fase móvel H₂SO₄ 5mM, num fluxo de 0,6 mL/min, com a temperatura do forno de 45°C e 25 minutos de tempo de corrida. Foi usado 20µL de injeção da amostra. Todas as amostras foram filtradas numa membrana de acetato de celulose com poros de 0,22 µm (Sartorius Stedim Biotech) antes de serem injetadas para a análise.

2.6 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 foi uma das que mais se adaptou às condições dessa região (PEREIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015). Para a produção dos vinhos, foram escolhidas nove linhagens indígenas diferentes de *S. cerevisiae*, representando aquelas com os melhores resultados de acordo com os parâmetros fermentativos estudados. Também foram escolhidas duas linhagens comerciais utilizadas na região do Vale do São Francisco para a produção de vinhos tintos (*S. cerevisiae* da marca Maurivin, AWRI 796, 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 C6 também é frequentemente utilizada na região para a produção de vinhos tintos.

2.6.1 Procedimentos laboratoriais para a produção dos vinhos

As linhagens escolhidas para a produção dos vinhos foram reativadas em meio sólido YM (1% de glicose; 0,5% de peptona bacteriológica; 0,3% de extrato de levedura; 0,3% de

extrato de malte; 2% de ágar) por 24h a 28°C. Em seguida, as leveduras crescidas foram transferidas, separadamente, para 10 mL do caldo de fermentação YPD (1% extrato de levedura, 1% peptona bacteriológica, 2% glicose) e colocadas “overnight” sob agitação de 100 rpm a 28°C. Após o crescimento, a concentração de células foi quantificada em Câmara de Neubaur. Assim foi possível calcular a concentração inicial de células de cada isolado para ser inoculado no mosto da uva (Syrah), sendo a fermentação iniciada com 2×10^6 UFC/ml. O volume final do mosto da uva foi de 600 mL, fermentados em garrafas de 750 mL vedadas com válvulas Müller, e mantidas numa 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 (10g/100L).

Após inoculação da levedura, as garrafas foram pesadas (tempo zero), e a posteriormente a cada 24 horas. Quando o valor da pesagem permaneceu constante durante 2 dias seguidos (não variando de 0,20g/dia) deu-se por encerrada a fermentação, e retiradas as alíquotas (filtradas com membrana de acetato de celulose de 0,2 μm 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 determinar as concentrações iniciais desses no mosto. Cada fermentação foi realizada em triplicata.

2.6.2 Análise da presença dos fenólicos totais dos vinhos

Os compostos fenólicos totais presentes nos vinhos foram quantificados pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando 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 utilizada foi de acordo com Singleton e Rossi (1965), com algumas modificações. As amostras do vinho 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, adicionado logo em seguida 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (Reagentes Analíticos Impex) e homogeneizados utilizando um vortex. Essa mistura foi deixada parada por 3 minutos para a reação, e, após esse tempo, adicionados 0,5 mL de Na_2CO_3 (20%) e 3,5 mL de água destilada. A mistura foi homogeneizada com auxílio de vórtex e mantida por 90 minutos protegida da luz (escuro). Após os 90 minutos, a leitura foi realizada a 725 nm em espectrofotometro. Um vinho feito por fermentação espontânea, sem a inoculação de uma levedura iniciadora, foi produzido nas

mesmas condições. 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.

2.6.3 Determinação dos compostos secundários e açúcares por HPLC

As dosagens dos açúcares (glicose e frutose), ácido acético, etanol e glicerol de cada vinho foram determinadas usando por HPLC, modelo Prominence Model LC-20A (Shimadzu), coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) e detector índice de refração (RID) RID-10A. Foi usada como fase móvel H_2SO_4 5mM a 25 °C, num fluxo de 0,6 mL/min a 65°C e 40 minutos de tempo de corrida. O volume de injeção da amostra foi de 20µL. Essa etapa foi realizada na Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza (CE), no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais. Todas as amostras foram filtradas numa membrana de acetato de celulose com poros de 0,2 µm (Sartorius Stedim Biotech) e diluídas 5 vezes (1:5) para as concentrações entrarem na curva padrão e não saturar a coluna.

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

A composição volátil dos vinhos foi determinada por Microextração por Fase Sólida (SPME-Solid Phase Micro Extraction) 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 et al. (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 (NaCl).

Microextração em Fase Sólida (SPME) e GC/MS:

Os compostos voláteis dos vinhos foram extraídos através 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 do tipo 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, mantida por 5 minutos, perfazendo 42 minutos de corrida cromatográfica.

Identificação dos compostos:

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 (obtidos por injeção de uma mistura de padrões contendo uma série homóloga de alcanos: C7-C30) e dados da literatura.

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

2.7 Análise estatística

Todos os resultados das microfermentações dos vinhos, 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 o programa Assistat (versão 7.7 beta).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação convencional e molecular das leveduras

Dos 368 isolados de leveduras, 184 foram identificados como *S. cerevisiae* indígenas, 109 não-*Saccharomyces* e 75 *S. cerevisiae* comerciais (identificados pelo RFLP-mtDNA) (Figura 2).

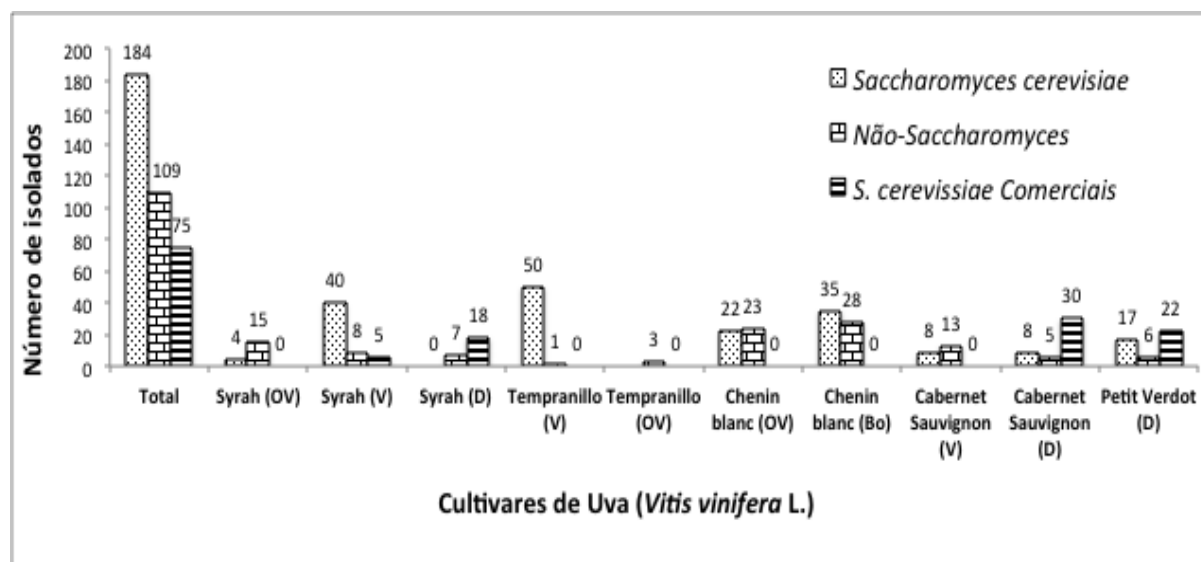


Figura 2. Número de isolados encontrados nos mostos fermentados de uva em cada variedade estudada. OV: Fazenda Ouro Verde; V: Fazenda Vinibrasil; D: Fazenda Ducos Vinícola; Bo: Fazenda Boticelli.

3.1.1 Caracterização molecular das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Dos 184 (71%) isolados indígenas de *S. cerevisiae* foram encontrados 22 perfis diferentes de *S. cerevisiae* (Figura 3). Os 75 (29%) isolados comerciais foram identificados como pertencentes a dois perfis comerciais diferentes. Foi feita a extração do DNA mitocondrial também das seis *S. cerevisiae* comerciais e comparadas com as indígenas (Figuras 4 – 8), sendo que das seis *S. cerevisiae* comerciais, duas (leveduras C3 e C4) apresentaram o mesmo perfil de restrição do DNA mitocondrial (Figura 4-B). Isso também foi observado por Fernández-Espinar et al. (2001) e de Ponzes-Gomes et al. (2014). Esses autores observaram que leveduras comercializadas como sendo linhagens diferentes foram iguais quando comparadas por essa técnica molecular. No presente trabalho, os perfis de restrição do DNA mitocondrial denominados P1 a P22 correspondem aos *S. cerevisiae* indígenas (Figura 5 – 8); os de P23 a P27 correspondem aos perfis das *S. cerevisiae* comerciais C1 a C6, respectivamente (Figura 4). Todos os 22 perfis de restrição do DNA mitocondrial das *S. cerevisiae* indígenas estão distribuídos nas figuras 5 a 8, além daqueles

das linhagens de *S. cerevisiae* comerciais que estão sendo comparados nos géis com as linhagens indígenas.

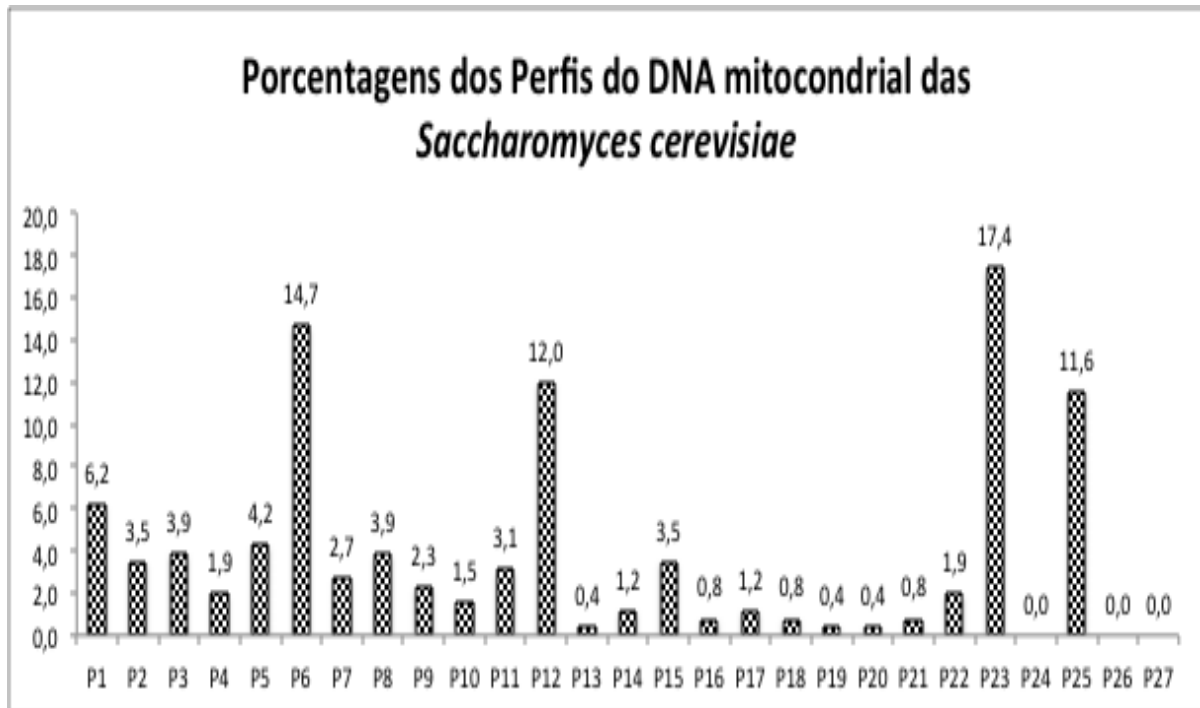


Figura 3. Porcentagem de perfis de restrição do DNA mitocondrial das *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de uvas do Vale do São Francisco. Os perfis P1 a P22 correspondem aos *S. cerevisiae* indígenas; os perfis P23 a P27 correspondem aos perfis das *S. cerevisiae* comerciais (leveduras C1 a C6, respectivamente).

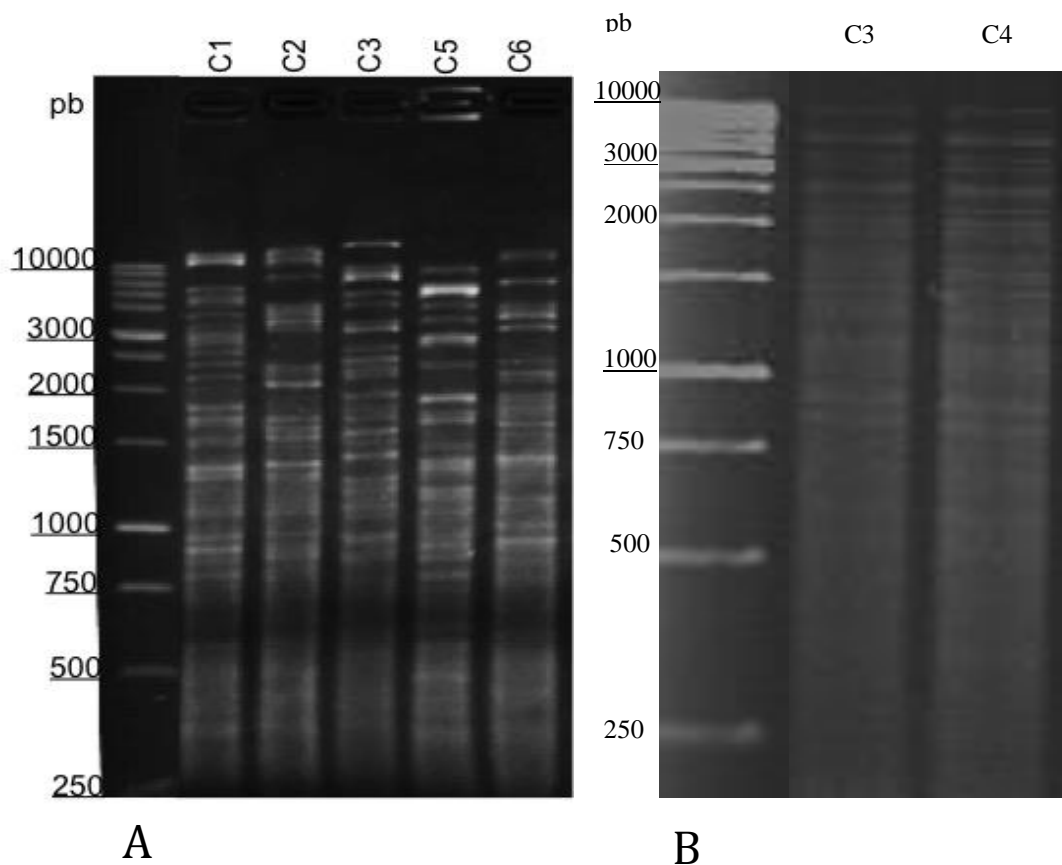


Figura 4. Perfis de restrição do DNA mitocondrial das linhagens comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas para a produção de vinhos do Vale do São Francisco. Marcador Molecular 1kb DNA ladder. Os códigos C1 (Maurivin, AWRI 796), C2 (Lalvin R2), C3 (Mycoferm Crio SP), C4 (Maurivin PDM), C5 (Mycoferm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

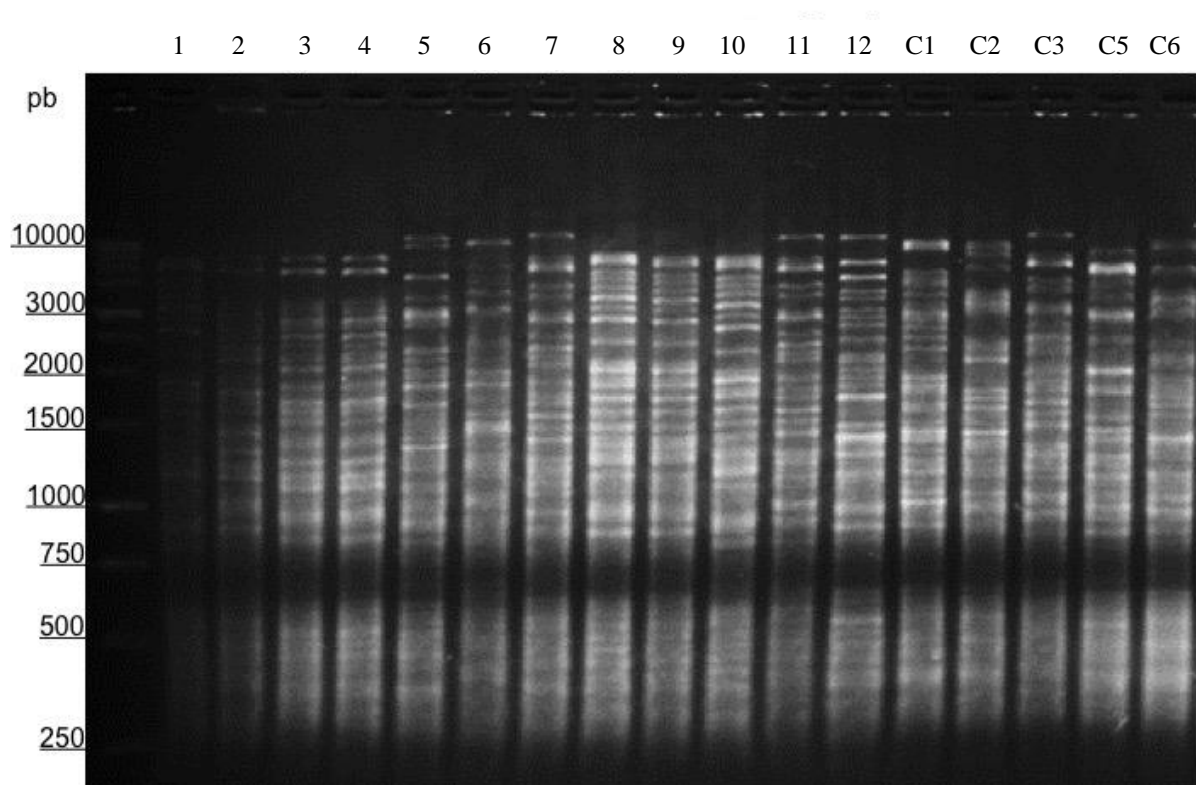


Figura 5 Perfis de restrição do DNA mitocondrial das linhagens indígenas e comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas do mosto fermentado de uvas (*Vitis vinifera* L.) do Vale do São Francisco. Marcador Molecular 1kb DNA ladder. Os códigos C1 (Maurivin, AWRI 796), C2 (Lalvin R2), C3 (Mycoferm 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.

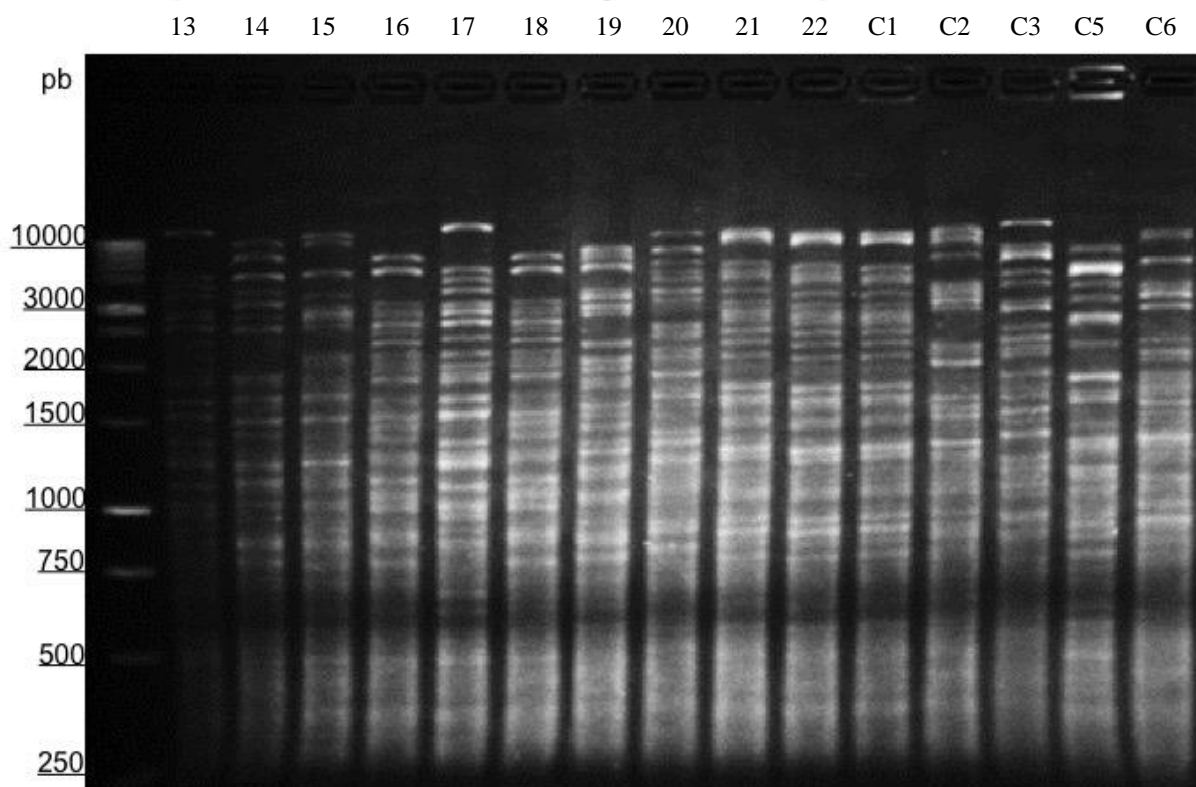


Figura 6 Perfis de restrição do DNA mitocondrial das linhagens indígenas e comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas do mosto fermentado de uvas (*Vitis vinifera* L.) do Vale do São Francisco. Marcador Molecular 1kb DNA ladder. Os códigos C1 (Maurivin, AWRI 796), C2 (Lalvin R2), C3 (Mycoferm 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 13 a 22 correspondem às *S. cerevisiae* indígenas 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).

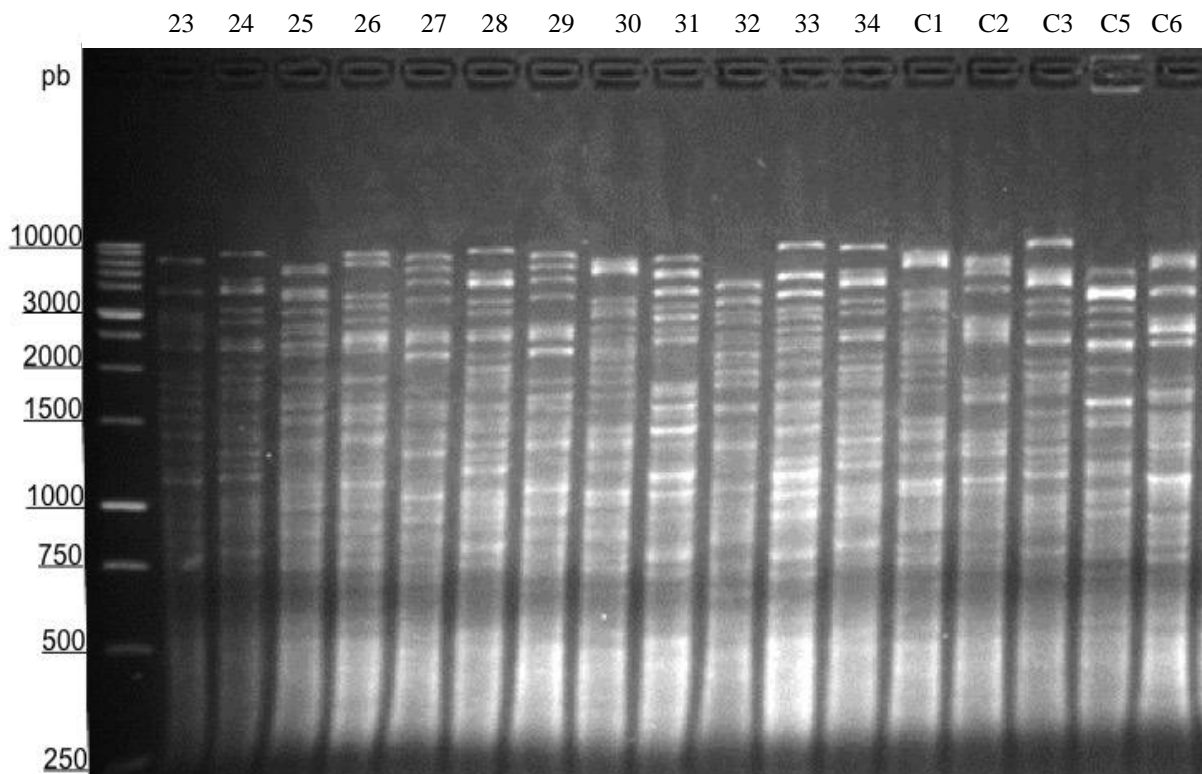


Figura 7 Perfis de restrição do DNA mitocondrial das linhagens indígenas e comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas do mosto fermentado de uvas (*Vitis vinifera* L.) do Vale do São Francisco. Marcador Molecular 1kb DNA ladder. Os códigos C1 (Maurivin, AWRI 796), C2 (Lalvin R2), C3 (Mycoferm 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 23 a 34 correspondem às *S. cerevisiae* indígenas 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).

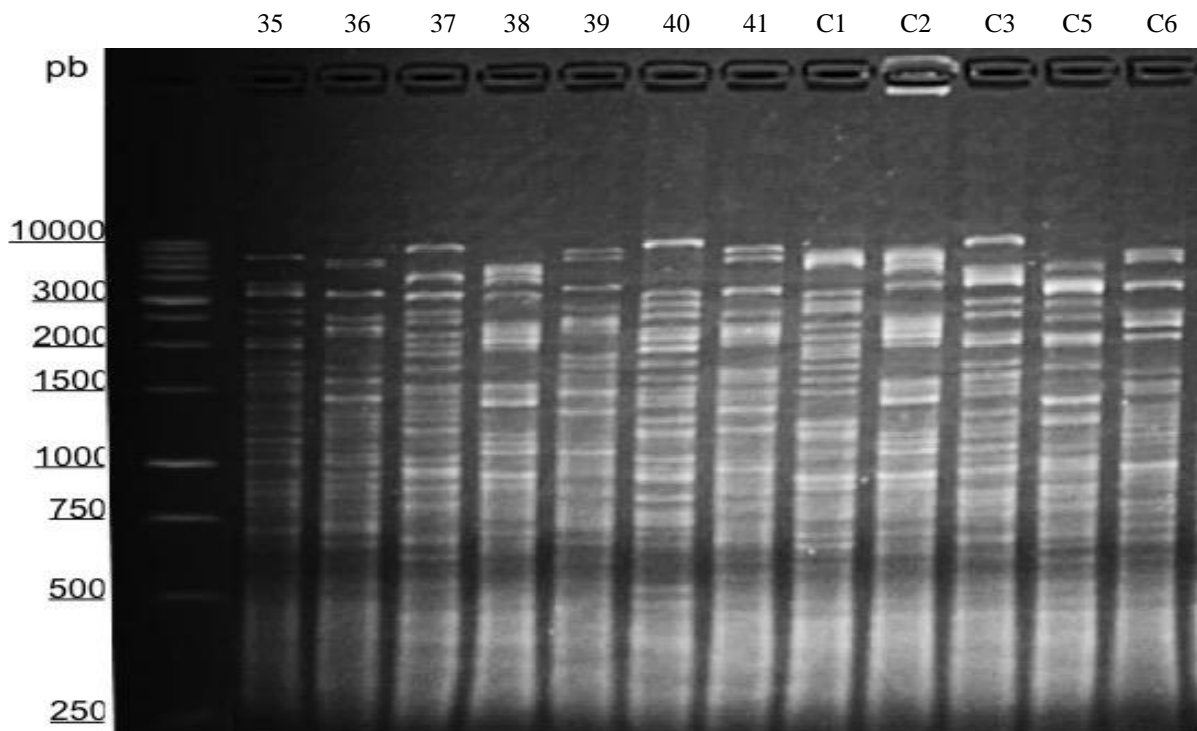


Figura 8 Perfis de restrição do DNA mitocondrial das linhagens indígenas e comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas do mosto fermentado de uvas (*Vitis vinifera* L.) do Vale do São Francisco. Marcador Molecular 1kb DNA ladder. Os códigos C1 (Maurivin, AWRI 796), C2 (Lalvin R2), C3 (Mycoferm 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 35 a 41 correspondem às *S. cerevisiae* indígenas de perfis P25, P21, P7, P22, P3, P8, P10, respectivamente. A levedura de código 35 corresponde ao mesmo perfil da levedura comercial C3 (P25).

De acordo com a figura 3, o perfil de restrição do DNA mitocondrial encontrado em maior número foi da 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 de *S. cerevisiae*), da linhagem indígena de perfil P12 (12%), e da linhagem comercial C3/C4, representada pelo P25 (11,6%). Nas figuras de 5 a 8, pode-se observar a diversidade de perfis de restrição do DNA mitocondrial das *S. cerevisiae* indígenas. A maior ocorrência de um perfil de restrição correspondente a uma linhagem comercial utilizada na região pode ser justificado pelo descarte de resíduos da elaboração dos vinhos produzidos nos vinhedos, possibilitando a colonização das uvas por essa levedura. A maior ocorrência da linhagem comercial C1 sugere que essa consegue se adaptar às condições presentes no vinhedo, sendo prevalente em relação às indígenas.

Capece et al. (2013a) estudaram a diversidade de *S. cerevisiae* isoladas depois da maturação dos tradicionais vinhos da Geórgia (União Europeia). De 70 *S. cerevisiae* indígenas, os autores encontraram 23 perfis diferentes de restrição do DNA mitocondrial. No estudo de Esteve-Zarzoso et al (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 perfil encontrado no presente trabalho. No entanto o percentual de perfis identificados no total de isolados indígenas de *S. cerevisiae* encontrados por esses autores foi superior ao do presente trabalho, sendo 32,35% contra 12%, respectivamente. Ponzzes-Gomes et al. (2014) encontraram 155 isolados indígenas de *S. cerevisiae* de mostos fermentados de uvas do Vale do São Francisco (Brasil), em 2008, e encontraram quatro perfis de mtDNA como pertencentes a linhagens indígenas e um pertencente a uma linhagem de *S. cerevisiae* comercial. Ponzzes-Gomes et al. (2014) encontraram um número menor de perfis de mtDNA de *S. cerevisiae* indígenas do que o encontrado no presente estudo (22 perfis). No trabalho de Ponzzes-Gomes et al. (2014), as leveduras foram isoladas em 2008 e na época o vinhedo de onde as uvas foram colhidas tinha aproximadamente três anos de plantado. 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 et al. (2005), um dos fatores que influencia na microbiota de leveduras nas uvas é a idade da vinha. Schuller et al. (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, esses já eram vinhedos bem estabelecidos na região, o que explicaria a quantidade de perfis de DNA mitocondrial encontrados. Ortiz et al. (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 et al. (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 mais de 190 perfis de mtDNA diferentes. Os autores também identificaram dois perfis de mtDNA referentes a linhagens comerciais utilizadas na região em dornas de fermentações espontâneas. Capece et al. (2012) encontraram 15 perfis de mtDNA diferentes de *S. cerevisiae* associados a fermentações espontâneas de vinho de uma região da Itália chamada “heroic vine-growing area”.

No presente trabalho, a variedade de uva Cabernet Sauvignon apresentou a maior ocorrência de perfis de restrição mtDNA para as *S. cerevisiae* indígenas, com 10 perfis diferentes (figura 9). No entanto, foi a uva com o menor número de isolados encontrados (16). A uva da variedade Chenin blanc apresentou seis perfis diferentes a partir 57 isolados de *S. cerevisiae* encontrados. A uva da variedade Syrah apresentou seis perfis de mtDNA diferentes a partir dos 43 isolados de *S. cerevisiae* encontrados. Uvas da variedade Tempranillo apresentaram cinco perfis diferentes a partir dos 50 isolados de *S. cerevisiae* encontrados. As uvas da variedade Petit Verdot apresentaram cinco perfis diferentes a partir dos 17 isolados de *S. cerevisiae* encontrados.

Um maior número de isolados de linhagens comerciais de *S. cerevisiae* foi encontrado na Fazenda Ducos e um menor na Fazenda Vinibrasil. Em todas as fazendas estudadas no presente trabalho, os substratos que sobram do processo de vinificação são reutilizados e espalhados no solo para que os nutrientes retornem aos mesmos. Nesse sentido, os resultados encontrados no presente trabalho sugerem que as linhagens comerciais C1 e C3 (igual a C4) estão atualmente adaptadas ao ecossistema do vinhedo das regiões estudadas, principalmente na Fazenda Ducos onde foram isolados aproximadamente 93% dessas linhagens. Vários autores também já relataram a presença de linhagens comerciais em fermentações espontâneas de vinho (ROSINI, 1984; CONSTANTÍ et al., 1998; SANTAMARÍA et al., 2005; MERCADO et al., 2011), como verificado no presente trabalho.

A partir destes resultados foram escolhidos isolados de cada perfil de restrição do DNA mitocondrial para realizar as microfermentações em mosto sintético. Quanto maior o

percentual dos isolados encontrados de um determinado perfil de restrição do DNA mitocondrial, maior foi o número de isolados selecionados para os testes de microfermentações. Esse número variou de um a nove isolados escolhidos em relação a cada um dos perfis de restrição do mtDNA das linhagens de *S. cerevisiae* encontradas.

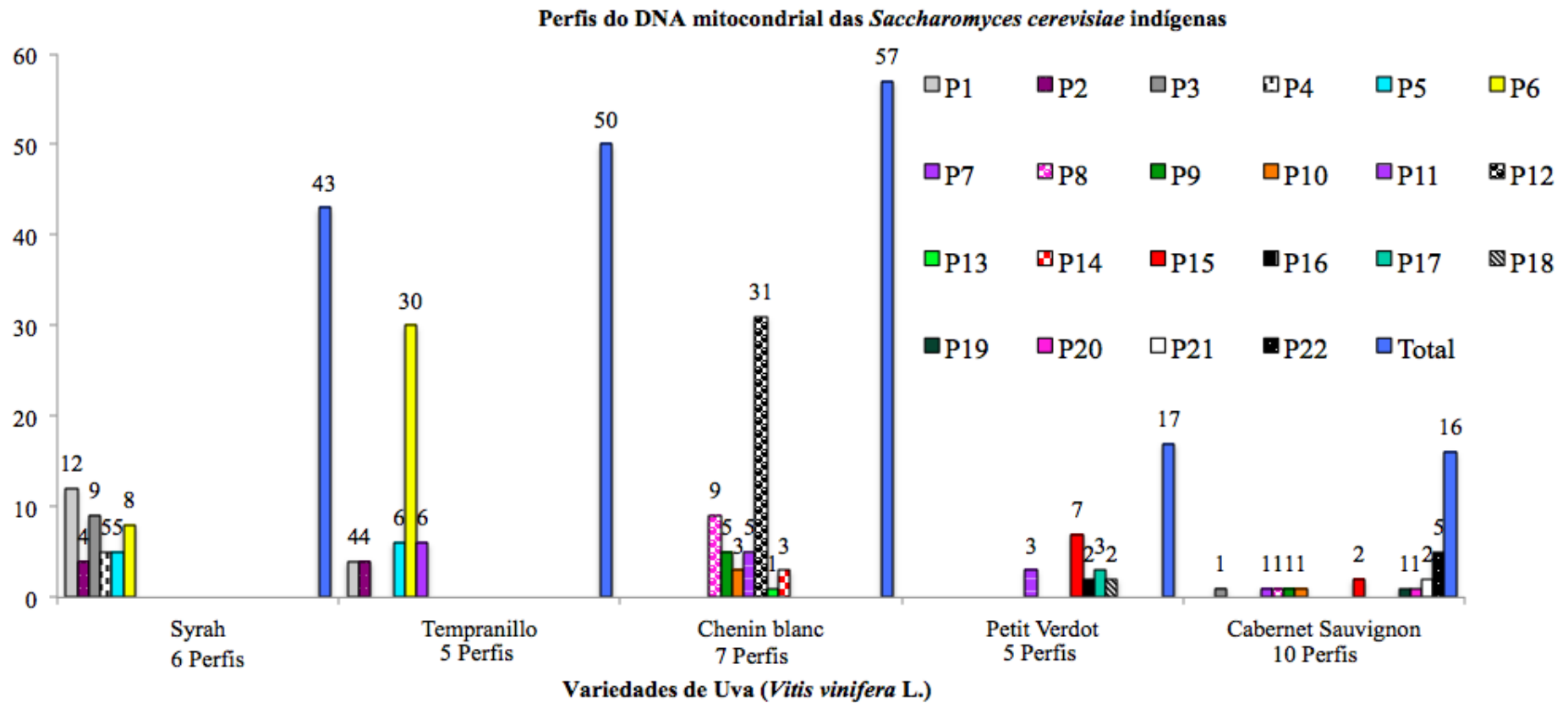


Figura 9. Número de perfis de restrição do DNA mitocondrial das *Saccharomyces cerevisiae* indígenas do Vale do São Francisco.

3.1.2 Identificação das espécies de leveduras não-*Saccharomyces*

Por meio dos testes fisiológicos, as leveduras não-*Saccharomyces* foram agrupadas como pertencentes a 23 grupos diferentes. Todos os isolados de cada grupo fisiológico foram caracterizados molecularmente utilizando o iniciador EI1. Isolados com o mesmo padrão de bandas caracterizados pelo iniciador EI1 foram considerados como pertencentes a mesma espécie de levedura (Rosa et al., 2007). Nas figuras 10 a 12 estão representados os perfis de bandas da PCR utilizando o iniciador EI1. Um representante de cada perfil diferente foi utilizado no sequenciamento para chegar ao nível de espécie. De acordo com os resultados do sequenciamento da região ITS e dos domínios D1/D2 da subunidade maior do rDNA, os 109 isolados de não-*Saccharomyces* identificaram-se às seguintes espécies: *Pichia kudriavzevii* (77,1%), *P. occidentalis* (0,9%), *P. membranifaciens* (3,7%), *P. manshurica* (0,9%), *Meyerozyma caribbica* (1,8%), *M. guilliermondii* (0,9%), *Zygosaccharomyces bailli* (1,8%), *Torulasporea delbrueckii* (0,9%), *Schizosaccharomyces pombe* (12%). Totalizando nove espécies em cinco gêneros diferentes de leveduras não-*Saccharomyces*.

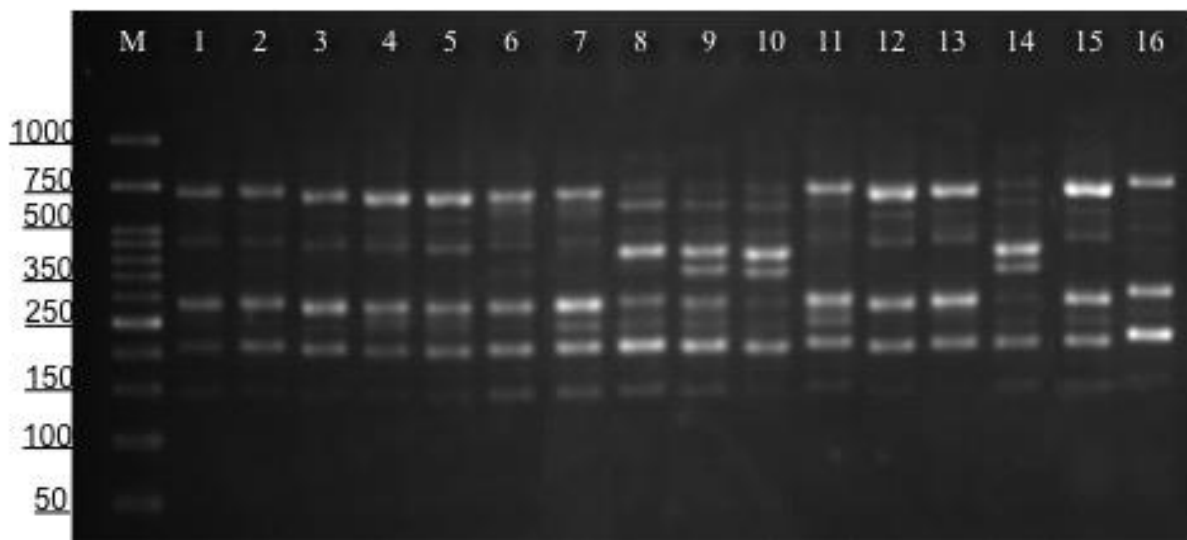


Figura 10. Perfil de bandas do DNA utilizando o iniciador EI1 dos isolados de leveduras não-*Saccharomyces* isolados do mosto fermentado das uvas do Vale do São Francisco. M: Marcador Molecular. Levedura 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 11; 12; 13; 15; 16: *Pichia kudriavzevii*. Levedura 8; 9; 10; 14: *Pichia membranifaciens*.

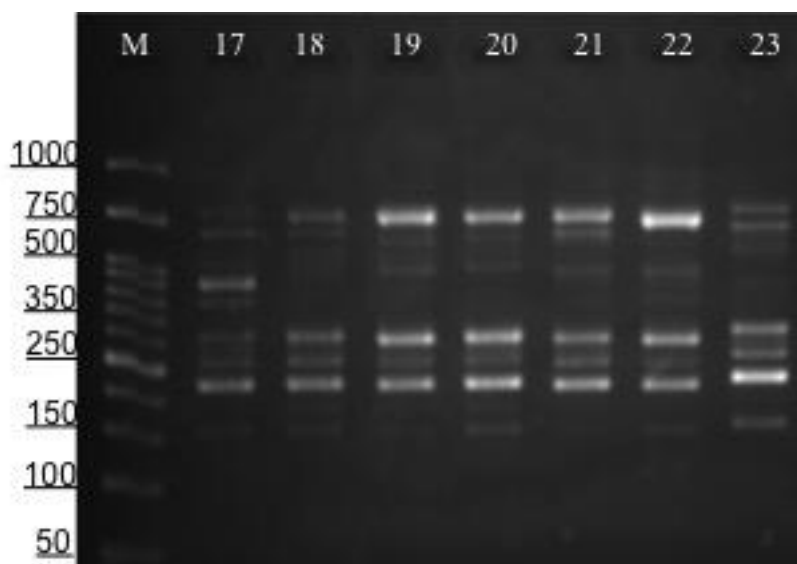


Figura 11. Perfil de bandas do DNA utilizando o iniciador EI1 dos isolados de não-*Saccharomyces* isolados do mosto fermentado das uvas do Vale do São Francisco. M: Marcador Molecular. Levedura 17: *Pichia manshurica*. Levedura 18; 19; 20; 21; 22; 23: *Pichia kudriavzevii*.

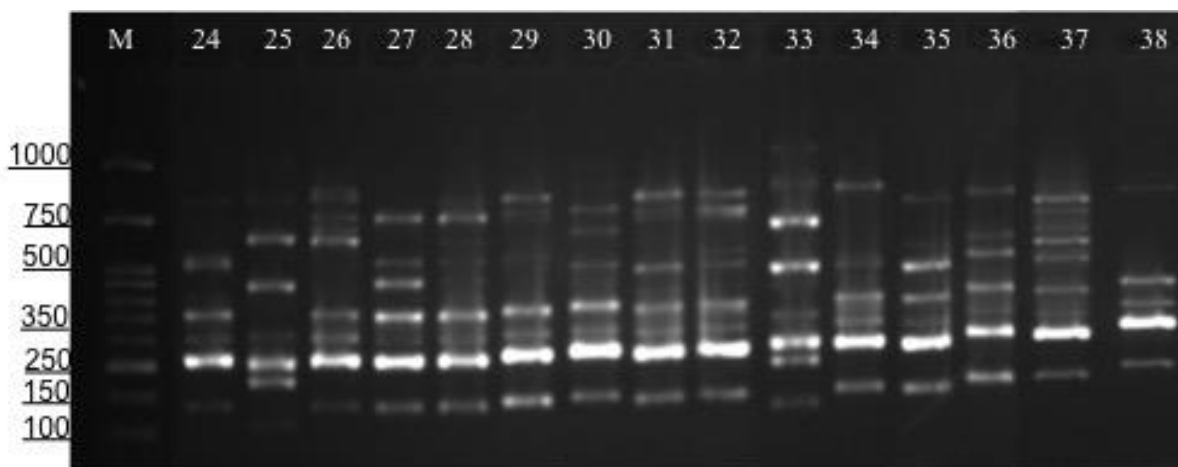


Figura 12. Perfil de bandas do DNA das regiões EI1 dos isolados de não-*Saccharomyces* isolados do mosto fermentado das uvas do Vale do São Francisco. M: Marcador Molecular. Levedura 24; 28; 29; 31; 32; 38: *Pichia kudriavzevii*. Levedura 25; 33: *Meyerozyma carbbica*. Levedura 26: *M. guillermundii*. Levedura 27; 35: *Zygosaccharomyces baillii*. Levedura 30: *Pichia occidentalis*. Levedura 34: *Torulaspota delbrueckii*. Levedura 36; 37: *Schizosaccharomyces pombe*.

Pichia kudriavzevii (= *Issatchenkia orientalis*) é uma espécie de levedura ascomicética fermentadora de glicose e que não assimila nitrato, apresentando-se como células ovais a alongadas, encontrada em suco de frutas ou frutas vermelhas. Essa levedura já foi encontrada

em outros ambientes, como em cerveja, fezes humanas, *Drosophila* spp., cerveja de gengibre, fermentação industrial, bolo, exsudatos de árvores, água do mar e sendo também associada com humanos e animais (KURTZMAN; FELL, 1998). Essa foi a espécie não-*Saccharomyces* isolada em maior percentagem no presente trabalho, representando 77,1% deste grupo de leveduras. Wang e Liu (2013) isolaram *P. kudriavzevii* em fermentações espontâneas de uva da variedade Muscat blanc em Jingyang (China), sendo a segunda levedura mais frequente no final da fermentação, ficando atrás somente da *S. cerevisiae*. *P. kudriavzevii* foi encontrada também em seis diferentes variedades de uva de vinho comumente usados na Índia (Chavan et al., 2009). Li et al. (2010) e Di Maro et al. (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 et al. (2012) também isolaram essa levedura em fermentações espontâneas das uvas na Itália. Clemente-Jimenez et al. (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 as mesmas apresentaram ótimos resultados quanto a produção de álcoois superiores, ficando atrás apenas de *S. cerevisiae* e *H. uvarum*. Essa levedura também foi encontrada por Clavijo et al. (2010) em fermentações espontâneas de uva de diferentes variedade durante as safras de 2006 e 2007 na região de “Serranía de Ronda” (Málaga, Espanha). Combina et al. (2005) isolaram, durante fermentações espontâneas de três mosto de Malbec na Argentina, essa mesma espécie de levedura. Portanto, esta espécie parece estar associada a uvas utilizadas em viticultura, como mostraram os resultados do presente trabalho, e aqueles obtidos pelos autores citados acima. No entanto, o papel ecológico desta levedura em uvas ou fermentações vinícolas ainda necessita ser melhor investigado.

Schizosaccharomyces pombe é uma espécie ascomicética fermentadora de glicose que não assimila nitrato e reproduz-se 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 desses ambientes já citados, essa espécie também já foi isolada em ambiente de vinhedo como no trabalho de Romano e Suzzi (1993). A resistência ao etanol por esta espécie de levedura é interessante já que dentre as não-*Saccharomyces* encontradas no presente estudo, *S. pombe* foi a segunda com maior porcentagem de ocorrência (12%), possivelmente pela capacidade de suportar elevadas concentrações de álcool.

Pichia occidentalis foi também isolada no presente trabalho. Di Maro et al. (2007) e Tristezza et al. (2013) isolaram essa espécie de fermentações espontâneas, respectivamente, feitas com uvas brancas Catalanesca em Campania (Itália) e na Região de Apulia. Bezerra-Bussoli et al. (2013) isolaram diversas espécies de leveduras, entre elas *P. occidentalis* de uma vinícola localizada no Brasil. Esses autores estudaram a ocorrência de leveduras em superfícies de uvas e mostos das variedades Isabel, Bordeaux e Cabernet Sauvignon.

Pichia membranifaciens já foi isolada em mosto de uvas, solo de vinhedo, cerveja, fezes, entre outros (KURTZMAN et al., 2011). Na Argentina, Combina et al. (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 et al. (2009) de diferentes variedades de uva de vinho comumente usados na Índia. Bourret et al. (2013) isolaram leveduras a partir de uvas colhidas de um vinhedo de pesquisa da Universidade Estadual de Washington em Prosser, Estados Unidos. Nesse trabalho, os autores identificaram 53 espécies, dentre essas *P. membranifaciens* e *Meyerozyma caribbica*, também encontrada no presente trabalho. *Meyerozyma caribbica* (= *P. caribbica*) é encontrada em vários tipos de substrato, sendo considerada uma espécie de ampla distribuição geográfica (KURTZMAN, 2011a).

Pichia manshurica é uma espécie ascomicética não fermentadora e isolada de fermentações naturais (KURTZMAN, 2011a). Tristezza et al. (2013) isolaram diversas espécies de leveduras na Região de Apulia (Itália) em fermentações espontâneas, incluindo *P. manshurica*. Os autores mostraram que esta espécie apresentava a habilidade de produzir histamina e cadaverina durante a fermentação do mosto. Saez de et al. (2011) isolaram leveduras deterioradoras e produtoras de aromas voláteis indesejáveis, sendo que as únicas espécies isoladas foram *S. cerevisiae* e *P. manshurica*. Ponzzes-Gomes et al. (2014) também isolaram essa levedura nos mostos fermentados das uvas produtoras de vinho no Vale do São Francisco. No presente trabalho, essa levedura foi encontrada em baixa frequência.

Meyerozyma guillermondii foi isolada em baixa frequência no presente trabalho. Esta espécie também já foi isolada por Clavijo et al. (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 et al. (2014) isolaram *M. guillermondii* de fermentações para a produção de vinhos tintos das uvas “Aglanico di Taurasi” sujeitos a maceração pós-fermentação na região de Taurasi (Itália). Portanto, esta espécie dever 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 bailli é uma espécie ascomicética fermentadora de glicose que é isolada de vários tipos de processos industriais, incluindo fermentações para a produção de vinhos (KURTZMAN; FELL, 1998; SWIEGERS et al., 2005). Esteve-Zaroso et al. (2010) isolaram essa levedura na fermentação dos vinhos Granacha na Espanha durante a safra de 2006. Li et al. (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. bailli*. 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), os autores também isolaram essa espécie em ambiente de vinhedo. Esta levedura está geralmente associada com processos de deterioração de alimentos e bebidas (JAMES; STRATFORD, 2011). A ocorrência de *Z. bailli* associada a uvas do Vale do São Francisco, como mostrado no presente trabalho, indica que estas leveduras deterioradoras estão também associadas a superfície da uva, podendo contaminar, a partir destas, o processo fermentativo.

Torulaspora delbrueckii é uma levedura generalista amplamente associada com alimentos e bebidas fermentadas (KURTZMAN, 2011b). Essa levedura foi encontrada em baixa frequência no presente trabalho. Di Maro et al. (2007) isolaram essa espécie de fermentações espontâneas feitas com uvas brancas Catalanesca em Campania (Itália). Vários outros estudos mostraram a ocorrência de *T. delbrueckii* em baixas frequências durante a produção de vinho (CLAVIJO et al., 2010; ORTIZ et al., 2013; PÉREZ-MARTÍN et al., 2014; SUN; LIU, 2014). Bely et al. (2008) mostraram que fermentações mistas utilizando *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii* produziam um equilíbrio melhor do flavor em vinhos doces, do que somente usando *S. cerevisiae*. Portanto, seria de interesse estudar o potencial enológico destas linhagens isoladas de fermentações de vinho.

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

Dos 184 isolados indígenas de *S. cerevisiae*, 46 não produziram H₂S no meio Bismuth Sulfite Agar (BSA) (Figuras 13 e 14).

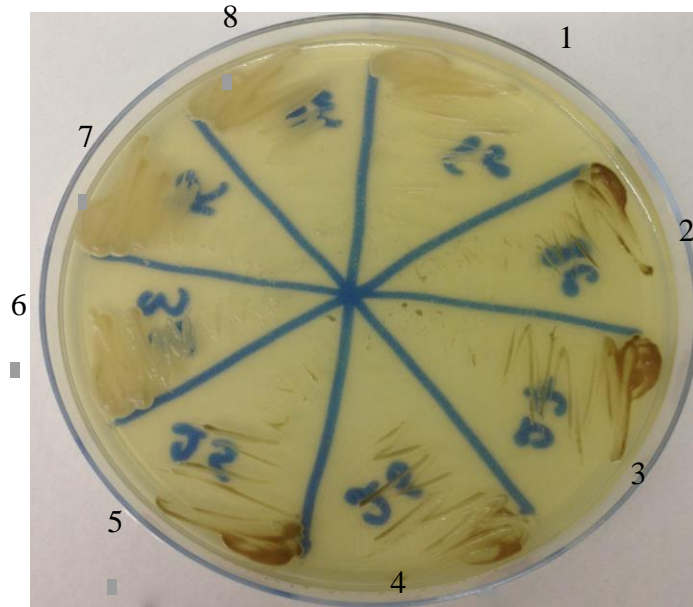


Figura 13. Isolados de *Saccharomyces cerevisiae* negativos para a produção de gás H₂S (Códigos: 1 - linhagem indígena 29; 6 - linhagem indígena 32; 7 - linhagem indígena 31; 8 - linhagem indígena 30) e positivos (marrons) para a produção de gás H₂S (Códigos: 2 - linhagem indígena 28; 3 - linhagem indígena 27; 4 - linhagem indígena 26; 5 - linhagem indígena 25).

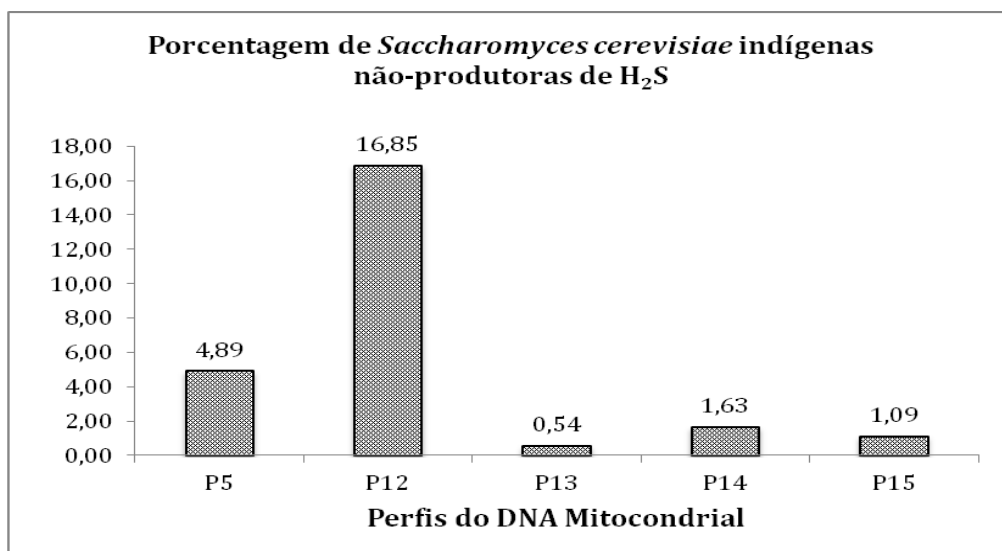


Figura 14. Porcentagem dos isolados indígenas de *Saccharomyces cerevisiae* negativos para a produção de H₂S com seus respectivos perfis de restrição do DNA mitocondrial.

A linhagem de *S. cerevisiae* com o perfil P12 de restrição do mtDNA não produziu H₂S, representando a maior percentagem dos isolados com esta característica fisiológica (figura 14). Os isolados não-produtores do gás H₂S, representando 25% dos 184 isolados de *S. cerevisiae* indígenas, são candidatos a testes para a produção de vinhos, já que não produzem esse composto indesejável que pode contribuir para a diminuição da qualidade sensorial da bebida. Outros autores também analisaram a produção do gás H₂S por *S. cerevisiae* como uma das formas de selecionar linhagens indígenas para a produção de vinho. Mauriello et al. (2009) selecionaram dentre 36 linhagens quatro com baixa produção, 23 com média produção e nove com alta produção desse gás. Capece et al. (2013a) selecionaram *S. cerevisiae* indígenas dos vinhos envelhecidos por um ano em dez diferentes vasos de terracota de uma vinícola na Geórgia (União Europeia). Das 13 linhagens encontradas, oito produziram esse gás em alta quantidade, e cinco com 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 de parâmetros analisados, tais como consumo de glicose, frutose, etanol, rendimento em etanol e produção de glicerol e ácido acético.

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 1). 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 1 - Características fermentativas das linhagens indígenas e comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na produção dos vinhos do Vale do São Francisco utilizando mosto sintético de fermentação.

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

Tabela 1 – Continuação.

Código	Tempo	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	Etanol (%v/v)	Rendimento em etanol (%)	Glicerol (g/L)	Ácido Acético (g/L)	mtDNA	H₂S *
117	48h	1,14 ^a	5,14 ^a	9,92 ^b	6,2 ^b	7,88 ^c	0,81 ^g	P7	P
118	120h	0 ^b	2,34 ^b	9,26 ^b	15,6 ^a	7,12 ^c	0,79 ^g	P7	P
124	48h	1,1 ^a	5,49 ^a	9,89 ^b	5,9 ^b	7,51 ^c	0,77 ^g	P7	P
144	96h	0,62 ^b	4,7 ^a	9,03 ^b	6,7 ^b	8,61 ^b	0,57 ^h	P8	P
155	144h	0 ^b	2,9 ^b	5,76 ^d	7,8 ^b	7,66 ^c	1,27 ^d	P8	P
156	168h	0 ^b	4,36 ^a	7,85 ^c	7,1 ^b	6,65 ^d	1,33 ^d	P8	P
293	96h	0,57 ^b	3,5 ^b	8,45 ^c	8,2 ^b	9,07 ^b	0,85 ^f	P8	P
127	120h	0 ^b	2,49 ^b	8,54 ^c	13,5 ^a	8,24 ^c	0,99 ^f	P9	P
129	120h	0 ^b	2,49 ^b	8,85 ^c	14,0 ^a	8,24 ^c	0,91 ^f	P9	P
131	120h	0 ^b	2,48 ^b	9,48 ^b	15,1 ^a	7,88 ^c	0,91 ^f	P9	P
247	144h	0 ^b	4,79 ^a	7,6 ^c	6,3 ^b	6,51 ^d	0,9 ^f	P9	P
132	144h	0 ^b	3,04 ^b	9,28 ^b	12,0 ^a	6,56 ^d	1,26 ^d	P10	P
133	144h	0 ^b	3,21 ^b	9,06 ^b	11,1 ^a	7,46 ^c	1,06 ^e	P10	P
135	144h	0 ^b	3,8 ^b	7,76 ^c	8,1 ^b	6,37 ^d	1,35 ^c	P10	P
295	144h	0 ^b	2,18 ^b	6,63 ^d	12,0 ^a	7,32 ^c	1,81 ^a	P10	P
136	144h	0 ^b	2,92 ^b	9,17 ^b	12,4 ^a	6,44 ^d	0,97 ^f	P11	P
137	120h	0 ^b	3 ^b	9,9 ^b	13,0 ^a	7,25 ^c	1,12 ^e	P11	P
138	144h	0 ^b	3,03 ^b	9,96 ^a	13,0 ^a	6,79 ^d	0,94 ^f	P11	P
173	48h	1,17 ^a	4,81 ^a	10,49 ^a	6,9 ^b	8,19 ^c	0,86 ^f	P12	N
174	48h	1,19 ^a	4,41 ^a	9,74 ^b	6,9 ^b	8,12 ^c	0,84 ^f	P12	N
177	48h	1,15 ^a	4,17 ^a	10,12 ^a	7,5 ^b	8,09 ^c	0,82 ^g	P12	N
182	48h	1,26 ^a	4,61 ^a	10,76 ^a	7,2 ^b	8,05 ^c	0,88 ^f	P12	N
186	48h	1,16 ^a	4,16 ^a	10,82 ^a	8,0 ^b	7,63 ^c	0,7 ^g	P12	N
187	48h	1,22 ^a	4,22 ^a	10,53 ^a	7,6 ^b	7,71 ^c	0,69 ^g	P12	N
189	48h	1,19 ^a	4,87 ^a	10,03 ^a	6,5 ^b	7,54 ^c	0,66 ^h	P12	N
167	144h	0 ^b	3,16 ^b	9,62 ^b	12,0 ^a	7,4 ^c	1,59 ^b	P13	N
194	144h	0 ^b	2,78 ^b	6,69 ^d	9,5 ^b	6,37 ^d	1,02 ^f	P14	N
195	144h	0 ^b	2,58 ^b	8,31 ^c	12,7 ^a	6,68 ^d	1,22 ^d	P14	N
198	144h	0 ^b	4,06 ^a	8,86 ^c	8,61 ^b	6,43 ^d	1,22 ^d	P14	N

Tabela 1 – Continuação.

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

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

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

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

Para todos os isolados, a concentração de glicose encontrada nas microfermentações variou de 0 a 2,63 g/L, de frutose de 2,18 a 6,55 g/L, de etanol (%) de 5,76 a 11,49%, de rendimento em etanol (%) de 5,0% a 16,5%, de glicerol de 5,64 a 10,81 g/L e de ácido acético de 0 a 0,87 g/L. O menor valor encontrado para o ácido acético (zero) foi aquele obtido a partir de fermentação utilizando a linhagem comercial C5 e o segundo menor valor foi de 0,6 g/L obtido para o isolado *S. cerevisiae* indígena 209 (Tabela 1).

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 (Tabela 1). Todos os isolados de *S. cerevisiae* estudados no presente trabalho apresentaram preferência para o consumo da glicose em relação ao consumo da frutose. O consumo da frutose pela levedura é menor na presença de altos níveis de etanol, e, por consequência, esse açúcar apresenta maiores valores de residuais durante a fermentação alcoólica (BERTHELIS et al., 2004).

A frutose é aproximadamente duas vezes mais doce que a glicose, com isso a presença desta como açúcar residual tem um efeito muito mais forte na doçura final do vinho, podendo ser a principal causa de doçura indesejável em vinhos secos. O alto teor de frutose residual também significa um rendimento de etanol mais baixo e um maior risco de contaminação microbiológica do vinho finalizado (LEE, 1987; BOULTON et al., 1996). Esse tipo de fermentação pode ser observado para os isolados 87, 115, 122, 124, 218 e 251 (Tabelas 1). A partir dos resultados mostrados na tabela 1, um isolado de *S. cerevisiae* indígena de cada perfil de restrição do DNA mitocondrial foi selecionado para as etapas posteriores, considerando os maiores valores de consumo de glicose e frutose, menor produção de ácido acético, maior rendimento em etanol, maior rendimento em glicerol e menor tempo de fermentação. Estes isolados estão marcados em negrito na tabela 1.

O etanol é o principal bioproduto da fermentação, podendo ser influenciado pelo conteúdo de açúcar, temperatura de fermentação e pela linhagem de leveduras utilizada. Esse álcool pode ser produzido em concentrações de 14 a 15% durante a produção do vinho, e acima dessas, são geralmente resultados de fortificação de açúcar durante a fermentação (JACKSON, 2008). No presente estudo, os valores de etanol variaram de 5,76 a 11,49% (v/v) (Tabela 1). 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). Vale ressaltar que o maior valor da produção de etanol (11,49 %v/v) foi da levedura indígena 209 isolada da variedade de uva Petit Verdot (Tabela 1).

O segundo bioproduto mais abundante na fermentação alcoólica é o glicerol, perdendo apenas para o etanol. O glicerol possui um papel organoléptico muito importante no vinho, apresentando um sabor adocicado, semelhante ao da glicose, mas é tão leve que apenas afeta a doçura em vinhos secos caso a concentração ultrapasse 5 g/L (JACKSON, 2008; 2009). Por ser viscoso, pensava-se que o mesmo afetava a viscosidade do vinho. No entanto, o glicerol só começa a influenciar quando a concentração é igual ou maior que 26 g/L, algo raro de ser

obtido (NOBLE; BURSICK, 1984; JACKSON, 2008). Todos isolados de *S. cerevisiae* testados no presente trabalho produziram valores acima de 5 g/L (Tabela 1). Os valores de glicerol encontrados para os isolados de *S. cerevisiae* indígenas foram, em sua maioria, melhores que os encontrados para as linhagens comerciais (Tabela 1). Outros estudos utilizando meios sintéticos de fermentação semelhantes ao usado no presente estudo obtiveram concentrações de glicerol semelhantes aos encontrados no presente trabalho para as linhagens de *S. cerevisiae* estudadas (MARTÍNEZ-MORENO et al., 2012; ANDORRÀ et al., 2012; GUTIÉRREZ et al., 2012).

Como 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 produzirá (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 entre 0,1 e 0,3 g/L (num mosto com concentração de açúcar menor do que 220 g/L) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). No entanto, de acordo com Fleet e Heard (1993), *S. cerevisiae* normalmente produz de 0,3 a 0,8 g/L de ácido acético. Níveis de até 0,6 g/L de ácido acético em um vinho são aceitáveis (ROMANO, 1990). Acima de 0,6 g/L, o vinho apresenta um gosto amargo, apresentando um efeito indesejável para a qualidade do mesmo. Todos os isolados apresentaram valores acima de 0,6 g/L de ácido acético, com exceção da *S. cerevisiae* comercial C5 que apresentou 0 g/L (não detectável pelo HPLC) (Tabela 1). Os menores valores encontrados para as *S. cerevisiae* indígenas foi para a linhagem 14 (uva Syrah) que apresentou 0,51 g/L de ácido acético e 209 (uva Petit Verdot) que apresentou 0,6 g/L de ácido acético. O maior valor de ácido acético foi produzido pela levedura 295 (uva Cabernet Sauvignon), com 1,81 g/L. No geral, 2,5% das *S. cerevisiae* indígenas produziram uma acidez intermediária e 97,5% produziram acidez alta. Valores de ácido acético elevados também foram encontrados para as *S. cerevisiae* comerciais utilizadas como controle (0,77 a 0,87 g/L), exceto a linhagem C5.

Valores semelhantes (ou mesmo acima) de ácido acético também foram encontrados em outras fermentações utilizando a mesma constituição de mosto sintético utilizada no presente trabalho (MARULLO et al., 2004; 2007, GUTIÉRREZ et al., 2012). No entanto, a fermentação realizada, no presente estudo, em pequenos volumes, 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 dos vinhos (em

volumes maiores), como mostrado no item 3.4.2, não foi constatada produção de ácido acético por meio do HPLC, corroborando o que foi escrito acima.

Por meio das características analisadas em conjunto (tempo de fermentação, consumo de glicose e frutose, produção de etanol, rendimento em etanol e produção de glicerol e ácido acético) foram selecionadas nove *S. cerevisiae* indígenas para a produção dos vinhos (em triplicatas). Os isolados escolhidos foram 14, 24, 30, 293, 133, 136, 248, 249, 294. Além destas, as leveduras comerciais C1 (Maurivin AWRI-796) e C6 (Fermol Rouge) foram escolhidas por serem usadas no Vale do São Francisco (VSF) na produção de vinhos tintos, sendo a C1 a mais utilizada. Além dessas 11 leveduras utilizadas na produção dos vinhos (não houve inoculação mista), no presente trabalho foi realizada uma fermentação sem inoculação de *S. cerevisiae*.

3.4 Produção dos vinhos em pequena escala

3.4.1 Análise da presença dos fenólicos totais dos vinhos

As concentrações dos compostos fenólicos totais dos vinhos (feitos com a variedade de uva Syrah) elaborados pelas nove leveduras indígenas de *S. cerevisiae* selecionadas (vinho 1 ao vinho 9), duas leveduras comerciais utilizadas no Vale do São Francisco (vinho 10 e 11) e um vinho elaborado por fermentação espontânea da uva (vinho 12) estão representados na tabela 2.

Tabela 2 - Resultados das concentrações dos compostos fenólicos totais encontrados nos vinhos elaborados com a variedade de uva Syrah produzidos pelas linhagens indígenas e comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* e no vinho feito por fermentação espontânea.

Vinhos	Conc. (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
Vinho 12 (Fermentação espontânea)	0,1633±0,01

Pode-se observar que os vinhos elaborados pelas *S. cerevisiae* indígenas apresentaram valores dos compostos fenólicos totais de 0,2450 a 0,3464 mg/mL, valores próximos ao encontrado nos vinhos elaborados 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). O vinho feito por fermentação espontânea (vinho 12) foi o que apresentou a menor concentração destes compostos (0,1633 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 et al. (2008) testaram 20 vinhos tintos de diversas origens e variedades quanto a concentração dos compostos fenólicos. Os autores observaram que o vinho o feito com a variedade Syrah tinha 1,871 mg/mL de compostos fenólicos, e o maior valor foi encontrado em um vinho tinto italiano (2,262 mg/mL). Minussi et al. (2003) mostraram que vinhos tintos brasileiros apresentaram concentração média dos compostos fenólicos de 1,920 mg/L. Lucena et al. (2010) mostraram concentrações elevadas dos compostos fenólicos totais em vinhos tintos do Vale do São Francisco, sendo os valores maiores para as variedades Syrah e Tannat, ambas com 5,9 g/L, e o menor valor encontrado de 3,2 g/L. Estes 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 realizada após o final da fermentação alcoólica. Esta etapa não foi realizada no presente estudo, e isto pode ter influenciado nos menores níveis de compostos fenólicos encontrados.

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

A tabela 3 mostra o consumo de glicose e frutose pelas linhagens de *S. cerevisiae* nos vinhos produzidos no presente trabalho. 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. Os resultados também sugerem que a fermentação alcoólica foi completada por todas as leveduras, já que toda a glicose foi consumida, exceto para o vinho 2.

A produção de etanol nos vinhos variou de 10,4% a 12,7% (v/v), estando na faixa considerada como vinho pela legislação brasileira (8-14%). A linhagem que produziu a maior concentração de álcool foi o isolado indígena que fermentou o vinho 1. A linhagem que

produziu a menor concentração de etanol foi a do vinho 4 (indígena). As leveduras comerciais C1 e C6, que produziram os vinhos 10 e 11, respectivamente, apresentaram teores alcoólicos semelhantes aos vinhos produzidos pelas linhagens indígenas selecionadas, e, em alguns casos, um teor inferior quando comparadas com os vinhos 1, 2, 3 e 7. Entretanto, os vinhos 10 e 11 produziram concentrações de etanol estatisticamente iguais aos vinhos 1, 2, 3, 7, 8 e 9. Os vinhos 5 e 6 produziram concentrações de etanol de 11,1% e 11,3%, respectivamente, iguais estatisticamente ao vinho 12 (fermentação espontânea) com 11,3%.

A produção do glicerol, como mostrado na tabela 3, variou de 8,3 a 9,6 g/L, estando em uma faixa considerada adequada (JACKSON, 2008; 2009), acima de 5 g/L (concentração que afeta a doçura em vinhos secos), e até melhor do que a verificada em outros trabalhos (ÁLVAREZ-PÉREZ et al., 2012; CADIÈRE et al., 2012; GUTIÉRREZ et al., 2012; ROSSOUW et al., 2012). O vinho 8 (levedura indígena) foi o que apresentou a maior quantidade de glicerol com 9,6 g/L. Entretanto este resultado não foi diferente estatisticamente quando comparado com os valores obtidos para os outros vinhos obtidos no presente trabalho.

Não foi detectado ácido acético em todas as amostras de vinho, mostrando assim que em vinhos jovens esse ácido quase não é encontrado. Vale ressaltar que nos experimentos de fermentação em mosto sintético, utilizando essas mesmas linhagens indígenas e comerciais (com exceção da comercial C5), valores elevados (acima de 0,6 g/L) para esse ácido foram encontrados (Tabela 1).

De acordo com as concentrações analisadas dos compostos secundários e açúcares, pode-se observar que as linhagens indígenas apresentaram resultados semelhantes ou superiores às leveduras comerciais e ao vinho produzido por fermentação espontânea. Esses resultados sugerem que essas linhagens poderiam, a partir de futuros estudos, ser utilizadas na produção de vinhos do Vale do São Francisco.

Tabela 3 - Concentrações de glicose, frutose, etanol, glicerol e ácido acético encontrados nos vinhos elaborados com a variedade de uva Syrah produzidos com as linhagens indígenas e comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* e do vinho produzido por fermentação espontânea.

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

Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

*ND...Não Detectado.

3.4.3 Determinação dos compostos voláteis nos vinhos

Trinta e quatro compostos voláteis foram identificados nos vinhos produzidos com as linhagens de *S. cerevisiae* selecionadas (Tabela 4).

Os grupos de compostos aromáticos que foram identificados neste trabalho foram os ésteres (18 compostos diferentes), ácidos (dois compostos diferentes), álcoois (cinco compostos diferentes) e outros compostos (oito 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 91,6% dos vinhos, dois compostos (Ciclohexano; 1,3-di-Tert-butil-benzeno) em 66,6%, um composto (Ácido decanóico) em 41,6%, dois compostos (9-decenoato de etila; 2-metoxi-2 metil-propano) em 33,3%, três compostos (Succinato de dietila; 2,4,5-trimethyl-1,3-dioxolane; 1-(1-ethoxyethoxy) pentano) em 16,6% e três compostos (Oleato de etila; 2-etil-1-hexano; 4-Hydroxyphenethyl alcohol) em 8,3% dos vinhos (Tabela 4).

Tabela 4 - Compostos voláteis encontrados nos vinhos elaborados com a variedade de uva Syrah produzidos com as linhagens indígenas e comerciais selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Composto (mg/L)	1**	2**	3**	4**	5**	6**	7**	8**	9**	10**	11**	12**
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	1,000
Ésteres Totais (18)												
Acetato de etila	32,910 _b	35,699 _b	30,707 _b	35,486 _b	25,661 _c	22,904 _c	24,391 _c	29,879 _b	24,096 _c	31,780 _b	33,523 _b	53,092 _a
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	0,170 ^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	0,970 ^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	0,088 ^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	0,206 ^a
Succinato de dietila	0,650 ^a	0,698 ^a	*ND	*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	0,450 ^b
Acetato de Fenil-Etil	0,010 ^d	0,018 ^d	0,016 ^d	0,102 ^b	0,021 ^d	0,018 ^d	0,043 ^c	0,123 ^b	0,064 ^c	0,033 ^d	0,030 ^d	0,182 ^a
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	0,020 ^c
9-decenoato de etila	*ND	0,005 ^c	*ND	0,016 ^b	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	0,003 ^c	*ND	0,021 ^a
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	0,186 ^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	0,008 ^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	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	0,052 ^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	0,073 ^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	0,056 ^a
Oleato de etila	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	0,020	*ND	*ND	*ND	*ND
2-etil-1-hexano	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	0,284

Tabela 4 – Continuação

Composto (mg/L)	1**	2**	3**	4**	5**	6**	7**	8**	9**	10**	11**	12**
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	0,624 ^d
Ácido decanóico	*ND	*ND	0,015 ^b	*ND	*ND	0,012 ^b	0,030 ^a	0,044 ^a	0,013 ^b	*ND	*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	158,364 _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	42,454 ^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	1,115 ^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	26,389 ^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	115,66 ^b

Tabela 4 – Continuação

Composto (mg/L)	1**	2**	3**	4**	5**	6**	7**	8**	9**	10**	11**	12**
Outros (8)												
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	*ND
2,4,5-trimethyl-1,3-dioxolane	*ND	*ND	8,809 ^a	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	8,408 ^a
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	17,260 ^c
2-metóxi-2-metil-propano	6,576 ^a	3,820 ^a	3,292 ^a	*ND	3,430 ^a	*ND	*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	5,457 ^a
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	0,021 ^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	*ND
4-Hydroxyphenethyl alcohol	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND	1,038	*ND	*ND	*ND

*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); Vinho 12 (Fermentação espontânea).

Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

O aroma do vinho é formado por centenas de compostos voláteis de natureza química, concentração e origem diferente. 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 composto é importante na formação do “flavour” do vinho e sendo diferenciado, principalmente, pela concentração produzida por cada levedura durante a fermentação alcoólica. 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 compostos voláteis detectados no presente trabalho nos vinho elaborados em escala de laboratório podem contribuir para o flavor, 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 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 dos grupos dos compostos aromáticos (AMERINE et al., 1980). Como pode-se observar na tabela 4, o vinho de número 8 elaborado pela linhagem *S. cerevisiae* 249 foi o que apresentou a maior concentração desse composto (371,091 mg/L). Os vinhos que apresentaram as menores concentrações deste álcool foram o vinho de número 12 (fermentação espontânea) (158,364 mg/L) e 3 (190,097 mg/L). De acordo com a literatura, o álcool isoamílico é encontrado em vinhos nas concentrações 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 valor 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 traz ao vinho um aroma floral de rosas (MARTÍ et al., 2003), e é encontrado nas 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). Os vinhos de número 11 e 12 produziram concentrações baixas desse composto, 24,781 mg/L e 37,757 mg/L, respectivamente. 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). Louw et al. (2010) encontraram concentrações mais baixas desse composto (14,31 – 96,27 mg/L) em vinhos produzidos com a variedade de uva Syrah na Sul da África.

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 desse não são interessantes na bebida (FRANCIS; NEWTON, 2005; SWIEGERS et al., 2005). O vinho que produziu a maior concentração deste composto foi o de número 9 (69,777 mg/L) e a menor o de número 3 (38,861). Portanto, todos os valores encontrados no presente trabalho estavam abaixo do limite para este composto.

O isobutanol apresenta um aroma alcoólico e é encontrado na faixa de 9 a 174 mg/L (FRANCIS; NEWTON, 2005; SWIEGERS et al., 2005). Os vinhos que produziram os maiores valores foram os de números 5 (182,322 mg/L), 12 (115,660 mg/L) e 8 (109,066 mg/L). O vinho que produziu a menor concentração foi o de número 3 (60,357 mg/L). Com exceção do vinho de número 5, todos os outros apresentam valores para este composto semelhante aqueles 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. O vinho que apresentou a maior concentração deste composto foi o de número 3 (1,814 mg/L) e os que apresentaram as menores concentrações foram os de número 12 (1,115 mg/L) e 5 (1,264 mg/L). Os valores encontrados no presente trabalho para esse composto podem ser considerados baixos.

Os ésteres são compostos aromáticos responsáveis pelas aromas frutados e florais dos vinhos e 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 apresenta 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 produziram as maiores concentrações foram os de números 12 (53,092 mg/L) e 2

(35,699 mg/L), sendo a menor concentração encontrada no de número 6 (22,904 mg/L). Todos os vinhos estão dentro da faixa considerada aceitável para um aroma frutado.

O acetato isoamílico é um éster muito importante, dando aos vinhos um aroma característico de banana e frutado, 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). O vinho que apresentou a maior concentração foi o vinho 8 (1,812 mg/L) e a menor concentração o de número 3 (0,484 mg/L).

O octanoato de etila apresenta um aroma frutado, doce, abacaxi, pêra e fruta verde, sendo produzido em baixas concentrações de 0,05 a 3,8 mg/L (FRANCIS; NEWTON, 2005; SWIEGERS et al., 2005). Os vinhos que produziram as maiores concentrações foram os de número 4 (0,570 mg/L), 3 (0,452 mg/L) e 12 (0,450 mg/L). O menor valor foi encontrada no vinho 8 (0,170 mg/L). Todos os vinhos apresentaram uma faixa aceitável para este composto. O composto decanoato de etila possui um aroma de uva, floral (AZNAR; ARROTO, 2007), estando compreendido na faixa de 0 a 2,1 mg/L (FRANCIS; NEWTON, 2005; SWIEGERS et al., 2005), sendo produzido em baixas concentrações. O vinho que produziu o maior valor foi o de número 3 (0,286 mg/L) e o menor o de número 7 (0,136 mg/L).

O Acetato de fenil-etil confere aos vinhos um aroma floral, de rosas e doce (AZNAR; ARROTO, 2007). Está compreendido na faixa de 0 a 18,5 mg/L (FRANCIS; NEWTON, 2005; SWIEGERS et al., 2005). Os vinhos que produziram as maiores concentração foram os de número 12 (0,182 mg/L), 8 (0,123 mg/L) e 4 (0,102 mg/L), e a menor o de número 1 (0,010 mg/L).

O Hexanoato de etila (caprato de etila) é um éster que apresenta um aroma de maçã, frutado e floral (AZNAR; ARROTO, 2007; GOMEZ-MIGUEZ et al., 2007). Esse composto é produzido em pequenas concentrações na faixa de 0,03 a 3,4 mg/L (FRANCIS; NEWTON, 2005; SWIEGERS et al., 2005). O vinho que apresentou uma maior concentração desse composto foi o de número 4 (0,265 mg/L) e a menor o de número 7 (0,115 mg/L).

Os ácidos conferem uma característica negativa aos vinhos em elevadas concentrações, assim como podem inibir também a fermentação. Dessa forma, não são interessantes em altas concentrações (CLARKE; BAKKER, 2004). O ácido octanóico apresenta um aroma de ranço, queijo e ácido graxo (CULLERE et al., 2004; LI, et al., 2008). Esse ácido deve apresentar traços até 41 mg/L em vinhos (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000). O vinho que apresentou a maior concentração foi o de número 7 (1,560 mg/L) e a menor o de número 2

(0,586 mg/L). Portanto, todos os vinhos apresentaram valores muito baixos para esse composto.

O ácido decanóico apresenta um aroma de gordura e desagradável (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 o maior para o de número 8 (0,044 mg/L) e a menor no de número 7 (0,012 mg/L). Esse composto não foi detectado nos vinhos produzidos pelas linhagens comerciais (vinhos 10 e 11) e por fermentação espontânea (vinho 12).

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). O resultados do presente trabalho sugerem que as linhagens indígenas de *S. cerevisiae* conseguiram produzir vinhos de qualidade quando utilizado como padrão os compostos voláteis produzidos, comparado com as linhagens comerciais testadas. Esses resultados são promissores para a busca de linhagens indígenas regionais que possam trazer tipicidade aos vinhos do Vale do Rio São Francisco, já que os produtores utilizam linhagens comerciais estrangeiras. A descoberta 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, pois se estará utilizando uma linhagem de *S. cerevisiae* típica da região.

4. CONCLUSÕES

- Os mostos fermentados das cinco variedades de uva (*Vitis vinifera* L.) colhidas em cinco 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.
- A análise dos perfis de restrição do DNA mitocondrial (RFLP-mtDNA) dos 259 isolados de *S. cerevisiae* obtidos do mosto fermentado das variedades de uva da região, quando comparadas com seis leveduras comerciais, mostraram a ocorrência de 22 perfis diferentes nas linhagens indígenas de *S. cerevisiae* indígenas. Além disto, foi possível detectar 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, apesar de serem comercializadas com nomes diferentes;
- 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 de processo fermentativo para a elaboração de vinhos
- Os vinhos produzidos pelas nove linhagens indígenas de *S. cerevisiae* (vinho 1 ao vinho 9) comparados com os dois vinhos produzidos por linhagens comerciais de *S. cerevisiae* (vinho 10 e 11) e pelo vinho feito por fermentação espontânea (vinho 12) apresentaram resultados semelhantes em relação ao consumo de açúcares e produção de etanol, glicerol e ácido acético. Portanto, quando analisado estes resultados, as linhagens indígenas utilizadas na elaboração destes vinhos, apresentam potencial para serem selecionadas como iniciadoras do processo fermentativo.

- Os vinhos produzidos pelas leveduras selecionadas apresentaram valores de compostos fenólicos muito abaixo dos encontrados na literatura. Isto pode ser explicado por terem sido elaborados em volumes pequenos, não havendo a fermentação malolática, contribuindo para uma menor concentração destes compostos nos vinhos obtidos;
- Os vinhos produzidos com as linhagens indígenas de *S. cerevisiae* produziram compostos voláteis semelhantes àqueles produzidos pelas linhagens comerciais. Vale destacar que compostos aromáticos frutados e florais foram detectados em concentrações altas nos vinhos 3 e 8. Além disto, o composto volátil 2-fenil-etanol (aroma floral e de rosas) foi produzido em concentração elevada nos vinhos 8, 7 e 9, muito acima das encontradas nos vinhos elaborados com as leveduras comerciais (vinho 10 e 11). Estes resultados sugerem que estas linhagens de leveduras indígenas, principalmente aquelas utilizadas para elaborar os vinhos 8, 7 e 9, apresentam potencial, após futuros 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.

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.

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 nº76 de 26 de novembro de 1986. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre. Diário Oficial da República federativa do Brasil, Brasília, 28 nov. 1986. Seção1, pt. 2.

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

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

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.

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.

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.

Esteve-Zarzoso, B., Gostínçar, 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.

- 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., Damberg, 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 selected 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., Bonnarne, 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., Cklic, 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.
- Miller, G.L., 1959. Use of Dynitrosalicylic 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.
- 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., Barrajon, 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*. *Industrie 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.

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: Development 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 dès périodes viticoles de production dans l’année em 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 cyanindin 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.

Wildenrad, 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.