



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS DE UVAS
CULTIVADAS NO VALE DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO
E SUA UTILIZAÇÃO NA FERMENTAÇÃO DO MOSTO DE
UVA**

MARIANA OLIVEIRA ASSIS

Salvador – BA
2012

MARIANA OLIVEIRA ASSIS

**IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS DE UVAS
CULTIVADAS NO VALE DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO
E SUA UTILIZAÇÃO NA FERMENTAÇÃO DO MOSTO DE
UVA**

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Eugênia de Oliveira Mamede
Co-orientadora: Prof^a Dr^aAláise Gil Guimarães

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade Federal da Bahia, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência
de Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

Salvador –BA

2012

A848i Assis, Mariana Oliveira.
Identificação das leveduras isoladas de uvas cultivadas no Vale do Submédio São Francisco e sua utilização na fermentação do mosto de uva /Mariana Oliveira Assis. - Salvador, 2012.
90f.; il.;30cm.

Orientadora: Professora Dr^a. Maria Eugênia de Oliveira Mamede
Co-orientadora: Professora Dr^a. Aláise Gil Guimarães
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Pós-Graduação em
Ciência de Alimento. Faculdade de Farmácia, 2012.

1. Não-Saccharomyces. 2. Biomassa. 3. Testes afetivos sensoriais. I. Universidade Federal da Bahia - UFBA. II. Mamede, Maria Eugênia de Oliveira. Guimarães, Aláise Gil. III. Título.

CDU: 663

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Identificação das Leveduras isoladas de uvas cultivadas no Vale do Submédio São Francisco e sua utilização na fermentação do Mosto de uva.

Autor: Mariana Oliveira Assis

Orientadora: Prof.^a Dr^a Maria Eugênia de Oliveira Mamede

Co-orientadora: Prof.^a Dr^aAlaíse Gil Guimarães

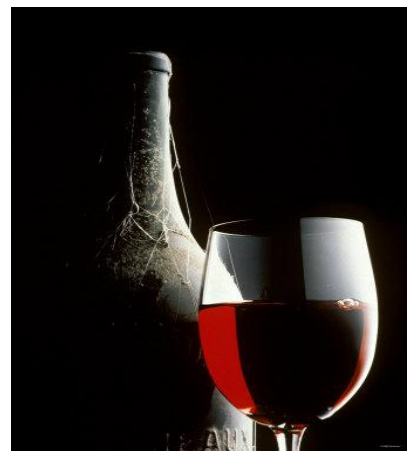
Aprovada em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr.Marcelo Andres Umsza Guez
Serviço Nacional de Aprendizagem
Industrial-(SENAI)

Prof^a Dr^a Adriana Oliveira Medeiros
Universidade Federal da Bahia-
(UFBA)

Prof^a Dr^a Maria Eugênia de Oliveira Mamede
Orientadora- Faculdade de Farmácia-(FFAR)
Universidade Federal da Bahia-(UFBA)



O vinho tem o poder de encher a alma de toda a verdade, de todo o saber e filosofia. Bossuet (1627-1704)

Que ninguém se engane só se consegue a simplicidade através de muito trabalho

*Enquanto eu tiver perguntas e não houver respostas... continuarei a escrever.
Clarice Lispector*

A minha mãe por me apoiar em meus projetos e me incentivar a seguir a carreira acadêmica.

A minha linda avó Tute pelo amor que sempre me dedicou.

A minha tia Isabel pelo seu apoio incondicional.

Ao meu amor e companheiro Danilo por me acompanhar nesta jornada e compreender as minhas ausências

Aos primos Arthur e Marcus, ao meu tio Roberto, as tias Vera, Simone e Tereza por sempre estarem presentes na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a Dr^a Maria Eugênia de Oliveira Mamede, orientadora, pelos ensinamentos, delicadeza e confiança a mim depositada.

A Prof^a Dr^a Alaíse Gil Guimarães, co-orientadora, sou agradecida pelo carinho, dedicação e a forma respeitosa que sempre me tratou.

Ao Prof. Dr Carlos Rosa, por ter me acolhido em seu laboratório, mesmo não sendo sua aluna, dispensando vários momentos do seu tempo em orientação em bancada e conversas que muito contribuíram para a execução do meu trabalho. Em especial pelo seu prazer em ser professor e pesquisador.

A todos do laboratório de Biotecnologia e Ecologia das Leveduras-UFMG pela atenção, em especial a Camila Gontijo, Renatinha, "Marianas" e Alice por me acompanharem durante a identificação das Leveduras.

Aos membros da banca examinadora Prof.^aDr.^a Adriana Medeiros e ao Prof.Dr. Marcelo Guez pelas sugestões e contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos professores Celso Duarte, Eliete Bispo e Ryzia Cardoso que me ensinaram a adquirir de forma prazerosa o conhecimento durante as disciplinas ministradas.

Agradeço as minhas amigas Miriam, Flávia, Cláudia, Bruna, Rachel por acreditarem em mim e me apoiarem.

Aos amigos que conquistei no mestrado, em especial a Daniele, Paula, Jaqueline, Andson, Cecília, Josy, Bruna, Priscila, Simone, Edgar, Leonardo Maciel, Andréa e Samantha pela troca de experiências, momentos de descontração, tensão e acima de tudo por acreditarmos que tudo iria dar certo.

A Adriana Coelho, Luize Sales e Priscila Nascimento pela colaboração no desenvolvimento das atividades e pela amizade.

A Priscila Oliveira, secretária da pós-graduação em Ciência de Alimentos pelo apoio e amizade, sempre disposta a ajudar.

A Faculdade de Farmácia da UFBA, a todos os funcionários e professores que tive o prazer de conviver. Aos julgadores que gentilmente participaram da análise sensorial.

Aos laboratórios LAPAAC, LABIMM, LAPESCA, - FFAR, pelo apoio às minhas análises, destaco a colaboração das Prof^a Maria Spínola e Janice Druzian e do Prof. Marcelo Castilho.

Aos professores Gileno Fernandes e Rosemeire Fiaccone, Jackson Conceição e Samila Oliveira pela colaboração.

As vinícolas da região do Vale do Submédio São Francisco que concederam as amostras para a realização deste trabalho.

A Adriano Castro pela disposição em ajudar e me atender em todas as horas que mais precisei.

À FAPESB pelo apoio financeiro. Ao CNPq pela bolsa de estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
INTRODUÇÃO GERAL	16
OBJETIVOS	18
OBJETIVO GERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
	19
CAPÍTULO 1	
REVISÃO DE LITERATURA	19
1 REGIÃO DO VALE DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO PRODUTORA DE UVA E VINHO	19
2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS LEVEDURAS	22
3 LEVEDURAS FERMENTATIVAS	24
4 IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DE VINIFICAÇÃO	30
5 CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA	33
6 AROMAS	35
6.1 COMPOSTOS AROMÁTICOS DERIVADOS DA UVA	36
6.2 COMPOSTOS AROMÁTICOS FORMADOS DURANTE A FERMENTAÇÃO PELA AÇÃO DE LEVEDURAS E BACTÉRIAS	37
6.3 COMPOSTOS AROMÁTICOS FORMADOS A PARTIR DO PROCESSO DE ENVELHECIMENTO VINHO	40
REFERÊNCIAS	41
	50
CAPÍTULO 2	
LEVEDURAS DE UVAS <i>VITIS VINÍFERA</i> L. DE REGIÃO EQUATORIAL	50
RESUMO	50
ABSTRACT	51
1INTRODUÇÃO	52
2 MATERIAL E MÉTODO	53
2.1 MATERIAL	53
2.1.1 Amostras	53
2.2 MÉTODO	54
2.2.2 Isolamento de leveduras	54
2.2.3 Manutenção das colônias selecionadas	54
2.2.4 Identificação das leveduras	54
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	59
CAPÍTULO 3	61

ESTUDO DO COMPORTAMENTO FERMENTATIVO DE LEVEDURAS DE UVAS <i>Vitis Viniferas</i> L.DA REGIÃO DO VALE SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO	61
RESUMO	61
ABSTRACT	62
1INTRODUÇÃO	63
2 MATERIAL E MÉTODO	64
2.1 MATERIAL	64
2.1.1 Leveduras utilizadas na fermentação	64
2.1.2 Amostras de mosto	64
2.2 MÉTODO	65
2.2.1 Identificação das Leveduras utilizadas na fermentação	65
2.2.2 Preparo e Análise do mosto	65
2.2.3 Condições de Fermentação	65
2.2.4 Avaliação do aroma dos mostos fermentados	66
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.1 ANÁLISES SENSORIAL- TESTE DE ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA	73
4 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80
CONCLUSÕES GERAIS	84
APÊNDICES	85
ANEXO	90

LISTA DE TABELA

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Produção de uva nos municípios de Lagoa Grande (PE), Santa Maria da Boa Vista (PE) e Casa Nova (BA) por rendimento médio/ Hectare.

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Características fisiológicas das leveduras isoladas do “Vale do Submédio São Francisco”.

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Características químicas dos mostos de uvas *Cabernet sauvignon*, *Chenin blanc* e *Rosé* coletados em duas vinícolas da Região do Submédio São Francisco

Tabela 2. Médias de aceitação do aroma de mosto fermentado *Chenin blanc*

Tabela 3. Médias de aceitação do aroma de mosto fermentado *Rosé*

Tabela 4. Médias de aceitação do aroma de mosto fermentado *Cabernet sauvignon*

LISTA DE FIGURA

CAPÍTULO 1

Figura 1. Ciclo de crescimento das leveduras.

CAPÍTULO 3

Figura 1A- Evolução da população de cultura pura de leveduras em mosto de uva *Chenin blanc*.

Figura 1B- Evolução do pH em mosto de uva *Chenin blanc*.

Figura 2A- Evolução da população de cultura pura de leveduras em mosto de uva *Rosé*.

Figura 2B- Evolução do pH em mosto de uva *Rosé*.

Figuras 3A - Evolução da população de cultura pura de leveduras em mosto de uva *Cabernet sauvignon*.

Figura 3B - Evolução do pH em mosto de uva *Cabernet sauvignon*.

Figura 4: Intenção de compra da amostra de vinho *Chenin blanc*.

Figura 5: Intenção de compra da amostra de vinho.

Figura 6: Intenção de compra da amostra de vinho *Cabernet sauvignon*.

ASSIS, Mariana Oliveira. **Identificação das leveduras isoladas de uvas cultivadas na região do Vale do Submédio São Francisco e sua utilização na fermentação do Mosto de uva**. 90f, 2012, Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Eugênia de Oliveira Mamede.

RESUMO

A vitivinicultura na região do Vale do Submédio São Francisco é uma atividade que vem se expandindo e ganhando espaço no mercado nacional e internacional na produção de vinhos. Para elaboração de vinhos na região utilizam-se leveduras selecionadas e importadas *S.cerevisae* e *S.cerevisae* variedade *bayanus*, esta tendência pode estar descaracterizando a tipicidade dos vinhos produzidos na região. O objetivo deste estudo foi isolar e identificar leveduras de uvas *Vitis viniferas* L., cultivadas na região do Vale Submédio São Francisco e selecionar aquelas que apresentam potencial fermentativo para produção de vinho. As leveduras foram isoladas e identificadas por meio de provas bioquímicas e moleculares. Um total de 60 isolados de leveduras indígenas foi obtido no meio Ágar YM e destes todos pertencentes ao grupo de não-*Saccharomyces*. Os testes fisiológicos mostraram que 20 colônias das 60 isoladas não foram agrupadas em nenhum gênero. Entretanto 40 dessas leveduras foram sugestivos de serem pertencentes ao gênero *Hanseniaspora* spp. Destas 40, 17 foram identificadas até a espécie, sendo sugestivas de *Hanseniaspora guilliermondi* (anamorfo *Kloeckera apis*). As linhagens de não-*Saccharomyces* *Hanseniaspora opuntiae* e *Cryptococcus flavescens* e *Saccharomyces cerevisae* foram utilizadas para realização da fermentação em escala laboratorial em mosto de uva *Chenin blanc*, *Rosé* e *Cabernet sauvignon* para estudar a cinética da fermentação por meio da determinação da biomassa celular e pH durante sete dias. A *H.opuntiae* foi a levedura não-*Saccharomyces* que não declinou o valor da biomassa celular no final das 168 horas da fermentação. O pH dos mostos fermentados manteve-se na faixa ideal para produção de vinho branco, *Rosé* e tinto. Testes afetivos sensoriais foram

realizados para determinar o perfil aromático das leveduras não-*Saccharomyces*, *H.opuntiae* e *C.Flavescens* e da *S.cerevisae* . A aceitabilidade das amostras e intenção de compra dos mostos em relação aos aromas de vinhos branco, Rosé e tinto foi avaliada nos períodos de 72; 96 e 120 horas de fermentação. A Análise Univariada de Variância (ANOVA) realizada entre as amostras, indicou que o aroma produzido pelo mosto fermentado *Chenin blanc* pela levedura *H.opuntiae*, apresentou a maior média de aceitação (7,3) no período de 120 horas, com intenção de compra de 76%. O aroma produzido pelas leveduras *H.opuntiae* e *S.cerevisae* no mosto Rosé apresentou a maior média de aceitação nos períodos de 72 e 96 horas da realização da análise sensorial (7,16 e 7,12). A maior média de intenção de compra foi no período de 96 horas (74%). A maior média de aceitação do aroma produzido pela *H.opuntiae* e *S.cerevisae* na fermentação do mosto *Cabernet sauvignon* foi aos períodos de 72 e 96 horas (5,26 e 5,66). A percentagem máxima de intenção de compra deste mosto foi de 32%. As leveduras não-*Saccharomyces* em especial as apiculadas, podem contribuir para a formação de aroma agradável.

Palavras-chaves: não-*Saccharomyces*, biomassa, testes afetivos sensoriais.

ASSIS, Mariana Oliveira. **Identification of yeasts isolate from cultivated grapes in the São Francisco Submid Valley region and its use in the fermentation of grape Must.** 90f, 2012, Dissertation (Master's degree) – Faculty of Pharmacy, Federal University of Bahia, Salvador, 2012.

Guiding: Prof^a Dr^a Maria Eugênia de Oliveira Mamede

ABSTRACT

The vineyards cultivation and wine manufacture in the São Francisco Submid Valley region is an activity that has been expanding and gaining ground on the domestic and international markets. For preparation of wine in this region selected yeasts are used and imported *S. cerevisiae species* and *S. cerevisiae species, bayanus* variety, this trend may be taking off the typical characteristics of the wines produced in the region. This study aimed to isolate and identify grapes yeasts *Vitis viníferas L.*, cultivated in the São Francisco Submid Valley region and select those that present potential for the fermentative production of wine. Yeasts were isolated and identified using biochemical and molecular evidence. Were isolated 60 indigenous yeasts found in the YM/Agar medium and all belonging to the Group of *non-Saccharomyces*. According to the physiological/biochemical tests of 60 isolated 20 colonies could not be grouped into no gender. However 40 of these were suggestive of belong to the *Hanseniaspora spp* gender. From these 17 were identified until the species, being suggestive of *Hanseniaspora guilliermondi* (anamorph *Kloeckera apis*). The two *non-Saccharomyces* strains used in the fermentative trials were identified through the sequencing D1/D2 region of 26S subunit of the ribosomal RNA in *Hanseniaspora opuntiae* and *Cryptococcus flavescens*. These lineages identified by molecular biology along with *Saccharomyces cerevisiae species* commercially acquired were used to achieve fermentation in laboratory scale in Chenin blanc, Rosé and Cabernet sauvignon grape must to study the kinetics of fermentation through the determination of cell biomass and pH for seven days. *H. opuntiae* was *non-Saccharomyces* yeast whose value cell biomass does not detract from the end of the 168 hours of fermentation. The pH of fermented musts remained on track ideal for production of White, Rosé and Red wine. Affective sensory tests were conducted to determine the aromatic profile of fermented musts by yeasts *non-Saccharomyces*, *H. opuntiae* and *C. Flavescens* and *S. cerevisiae species*. The acceptability of samples and purchase intention of musts in relation to flavourings in White, Rosé and Red wines was evaluated in periods of 72; 96 and 120 hours of fermentation. The variance univariate analysis (ANOVA) held between samples, indicated that the aroma produced by fermented must Chenin blanc by yeast *H. opuntiae*, presented the highest average acceptance (7.3) within 120 hours, with intent to purchase of 76. The aroma produced by yeasts *H. opuntiae* and *S. cerevisiae species* in Rosé must presented the highest average acceptance during periods of 72 and 96 hours (7.16 and 7.12) the day of sensory analysis, the

highest average purchase intention was in period of 96 hours (74%). The highest average acceptance aroma produced by *H. opuntiae* and *S. cerevisiae species* in fermentation of Cabernet sauvignon must was to periods of 72 and 96 hours (5.26 and 5.66). The maximum percentage of purchase intention of this must was 32. The non-*Saccharomyces* yeasts particularly apiculates, can contribute to the formation of pleasant aroma.

Keywords: non-*Saccharomyces*, biomass, affective sensory tests.

INTRODUÇÃO GERAL

As leveduras são amplamente empregadas na produção de alimentos e bebidas, a exemplo dos vinhos, cervejas e cachaças. Para a produção do vinho por meio da fermentação espontânea são utilizadas leveduras indígenas pertencentes aos grupos não-*Saccharomyces* e *Saccharomyces*, contribuindo de maneira expressiva para as propriedades sensoriais desta bebida. A distribuição ecológica das leveduras que participam do processo de produção do vinho por meio da fermentação espontânea tem sido determinada a partir da microbiota presente nas superfícies de uvas frescas, mosto de uva e vinho, bem como nas interações levedura-levedura e levedura-bactéria.

As diversas espécies de leveduras não-*Saccharomyces* e *Saccharomyces* são responsáveis por iniciarem o processo de fermentação alcoólica, ressaltando-se a participação das não- *Saccharomyces* na etapa inicial, por sua alta densidade nas cultivares de uvas. No entanto, à medida que o ambiente se modifica e aumenta a concentração de etanol, a atividade metabólica dessas leveduras é inibida e então as *Saccharomyces* tornam-se predominantes. A espécie *Saccharomyces cerevisiae*, é considerada a principal espécie no estágio final da fermentação alcoólica.

A produção de vinho fino por meio da fermentação espontânea é tradicionalmente creditada aos países da Europa. No Brasil, as vinícolas inoculam durante o processo fermentativo leveduras selecionadas desidratadas da espécie *Saccharomyces cerevisiae* ou *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus*, como forma de garantir um produto padronizado e com controle de qualidade. A região do Vale Submédio São Francisco-Brasil vem se destacando na produção de vinhos finos utilizando uvas *Vitis viniferas* L. de qualidade em qualquer época do ano. As uvas utilizadas na produção de vinho fino na região do Vale Submédio São Francisco pertencem à casta *Vitis viniferas* L. Dentre estas, pode-se destacar as *Vitis viniferas Carbenet sauvignon*, *Merlot*, *Syran*, *Alicate bouschet*, *Moscato canelli*, *Chenin blanc* e *Petit syrah*.

A expressiva produção de uva de qualidade nesta região se concretizou com a viabilização da técnica de irrigação, possibilitada pela disponibilidade de água do Rio São Francisco, Barragem do Sobradinho e ademais da intervenção do homem. Estas estratégias adotadas conjuntamente

permitiram superar as condições climáticas inadequadas da região, as quais são quentes e secas e não permitiriam a produção de uvas e vinho de qualidade em situações normais.

É de grande importância investigar a microbiota indígena que compõe as cultivares *Vitis viniferas* L. na região do Vale Submédio São Francisco, para conhecer as características quimiotaconômicas das leveduras no processo de transformação do mosto de uva em vinho e desta forma identificar quais leveduras podem contribuir positivamente na produção de vinhos com características organolépticas positivas.

Desta forma, este estudo teve como propósito isolar, identificar e avaliar o potencial fermentativo das leveduras isoladas de uvas *Vitis viniferas* L. da região do Vale Submédio São Francisco.

OBJETIVOS

1 OBJETIVO GERAL

Estudar o comportamento fermentativo das espécies de leveduras isoladas e identificadas de uvas *Vitis viniferas* L. cultivadas na região do Vale Submédio São Francisco que apresentam potencial para produção de aroma em mosto de uva.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar leveduras de cultivares de uvas frescas *Vitis viniferas* L.;
- Identificar as leveduras por meio de provas bioquímicas e moleculares;
- Estudar a fermentação do mosto pelas leveduras isoladas e identificadas em escala laboratorial;
- Avaliar o potencial de formação de aroma das leveduras por meio de testes sensoriais.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1 REGIÃO DO VALE DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO PRODUTORA DE UVA E VINHO

A região do Vale do Submédio São Francisco é uma das três novas regiões vinícolas brasileiras que se destacam como produtoras de vinhos finos. Situada no semiárido do Nordeste do Brasil, entre os estados de Pernambuco e Bahia, localizada entre os paralelos 8°-9°S de latitude sul, longitude 40°W e altitude ao redor de 350 m em áreas de paisagem típica de Caatinga do Sertão nordestino, entrecortada pelo Rio São Francisco (IBRAVIN, 2010). A Região é formada pelas cidades de Lagoa Grande, Santa Maria de Boa Vista, Santo Antônio, Petrolina (Pernambuco), Casa Nova e Juazeiro (Bahia) e é considerada uma das novas regiões vitivinícolas brasileiras produtoras de vinhos finos (CARNEIRO; COELHO, 2007).

O clima tropical característico da região é também conhecido como clima de variabilidade intra-anual. Nos meses de junho a setembro predominam o inverno, com clima seco, sem chuvas, com temperaturas baixas à noite e mais amenas durante o dia; os meses de abril e maio e de outubro a dezembro, se caracterizam por período seco, sem chuvas, com temperaturas altas durante o dia e amenas à noite. Os meses de janeiro a março se caracterizam por período úmido, com chuvas e altas temperaturas durante o dia e à noite (MIOLO, 2003). Nesta região, registram-se temperatura de 26°C, 50% de umidade relativa do ar e indicadores climáticos médios de 500 mm de precipitação pluvial, concentrada entre dezembro e março. Essa variabilidade climática possibilita a produção de uvas com qualidades específicas e diferenciadas, além de assegurar a produção contínua da fruta durante o ano (IBRAVIN, 2010; MIOLO, 2003).

As características climáticas típicas da região colocam em destaque a vitivinicultura desenvolvida no Vale do Submédio São Francisco diferenciada em relação às demais regiões do Brasil. Além dos fatores climáticos do Vale do São Francisco, a exemplo da temperatura, insolação, umidade relativa do ar; as propriedades físico-químicas do solo e a tecnologia empregada nas lavouras irrigadas, também influenciam no desempenho de uvas nesta região, obtendo assim duas safras e meia de uva por ano (CARNEIRO; COELHO, 2007).

A uva é a matéria-prima da elaboração de vinho e fonte primária de leveduras responsáveis pela fermentação alcoólica. A qualidade da uva é determinada, sobretudo pelo clima. As propriedades fisiológicas da videira, como plantas do clima temperado, e interação destas com as condições climáticas da região resultam em uma situação especial que confere qualidade as uvas de vinificação na região do Vale do São Francisco (SOARES; LEÃO, 2009).

Historicamente a vitivinicultura na região do Vale Submédio São Francisco teve início no meado dos anos 80 com o plantio de videiras europeias procedentes do Sul do país. Em meados dos anos 90 e início do ano 2000, novas empresas se instalaram e investiram na região, resultando em aumento da produtividade (PEREIRA, 2007). Essa região é considerada a principal vinícola tropical brasileira, com aproximadamente 10.500 hectares de vinhedos (IBRAVIN, 2010).

A Bahia, atualmente é considerada o quarto produtor de uva do país, com expressivo crescimento da produção (27,4%) e rendimento médio (17,7%) no período de 2004 a 2005. A região Nordeste é promissora quanto ao cultivo da uva. No Vale do São Francisco, embora predomine o cultivo de uvas de mesa, o mercado de uvas para vinhos está em plena expansão. É nessa região que estão situados os municípios de Petrolina (PE), segundo maior município produtor do Brasil e detentor do recorde nacional de rendimento médio em 2005 (34.000 kg/ha) e Juazeiro (BA), o terceiro maior município produtor do país (IBGE, 2006).

A produção de uva dos municípios de Santa Maria de Boa Vista e Lagoa Grande (Pernambuco) e Casa Nova (Bahia) que compõem a região do Vale do Submédio São Francisco, onde originaram a matéria-prima deste estudo está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. A produção de uva nos municípios de Lagoa Grande (PE), Santa Maria da Boa Vista (PE) e Casa Nova (BA) por rendimento médio/ Hectare

Município	Ano						
	2004 (Kg/ha)	2005 (Kg/ha)	2006 (Kg/ha)	2007 (Kg/ha)	2008 (Kg/ha)	2009 (Kg/ha)	2010 (Kg/ha)
Lagoa Grande (PE)	27.428	27.534	27.276	29.500	30.956	28.611	28.000
Santa Maria da Boa Vista (PE)	29.333	29.451	29.451	27.777	27.446	26.666	28.000
Casa Nova (BA)	25.000	30.000	30.000	30.000	22.000	25.000	24.000

Fonte: IBGE, Produção Agrícola Municipal 2010. Rio de Janeiro: IBGE, 2011.

Existe grande variedade de espécies de videiras cultiváveis em todo o mundo, as que vêm se destacando na região do Vale Submédio São Francisco para fabricação de vinhos finos e de qualidade são as européias *Vitis viniferas* L., que se adaptaram bem ao clima seco, baixa umidade relativa do ar e insolação, além de ser a variedade que produz os melhores vinhos (CARNEIRO; COELHO, 2007).

A variedade de uva tinta *Cabernet sauvignon*, *Merlot* e *Syrah* (*Vitis viniferas* L.) cultivadas no Brasil, sobretudo na região do Vale Submédio São Francisco, são as variedades tintas mais utilizadas na vinificação, por melhor se adaptarem às condições edafoclimáticas da região e por resultar em vinhos finos e delicados. O vinho produzido pela casta *Cabernet sauvignon* tem caráter varietal, riqueza em taninos e complexidade de aroma e *buquet*. Entretanto, tem-se observado que a produção do vinho com a cultivar *Cabernet sauvignon*, nem sempre atinge coloração desejada, sendo necessário corte com outras espécies de uvas tintureiras, como a *Alicante* (*Vitis vinifera* L.) (JUBILEU; SATO; ROBERTO, 2010). A cultivar *Merlot* é originária do Médoc (França) e produz vinhos de qualidade e varietal. A *Syrah* é uma das mais antigas castas cultivadas na França, o vinho produzido é bem característico pelo seu aroma e *buquet* (CAMARGO, 2009). Uma das principais variedades de uvas *Vitis viniferas* L. branca atualmente cultivadas na Região do Vale Submédio São Francisco destinadas exclusivamente a produção de vinhos finos e que mais se adaptaram a região foram a *Moscato canelli* e a *Chenin blanc*, oriunda da Itália e França respectivamente e introduzidas nesta Região no início da década de 1980 (PEREIRA, 2007).

O grau de maturação Ideal para a colheita das uvas irá depender do estilo de vinho a ser produzido. As uvas para a elaboração de vinhos espumantes devem ser colhidas quando estiverem com grau de maturação em uma faixa de 17 a 18° Brix, as uvas para vinhos brancos, entre 18 a 20° Brix e uvas para vinhos tintos entre 18 a 22°Brix, podendo sofrer variação (MANDELLI; ZANUS, 2009).

Atualmente estima-se a existência de área de 700 ha de parreirais com cultivares que dão origem a aproximadamente 7 milhões de litros de vinho/ano, sendo 80% destinada à produção de vinho tinto e 20% branco. Estudos avançados voltados ao zoneamento vitivinícola da região indicam o potencial de

outras cultivares, adaptadas às condições locais e aptas a contribuírem para a tipicidade dos produtos vitivinícolas regional. Esta região produz vinhos jovens, com características peculiares de aroma e sabor e vinhos envelhecidos, o que promove uma maior complexidade do aroma e estrutura dos vinhos (PEREIRA, 2007).

Em 2005, o Submédio São Francisco respondeu por 15% da produção nacional de vinhos finos, destinados ao mercado interno e externo. Os vinhos produzidos nesta região são exportados para países da Europa, para o Japão e Estados Unidos. O setor vinícola da região do Vale Submédio São Francisco vem se expandido no decorrer dos anos, sendo registrado incremento anual de 20% da produção de vinho (CARNEIRO; COELHO, 2007).

2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS LEVEDURAS

As leveduras são organismos pertencentes ao grupo dos fungos, heterotróficos, unicelulares, cujos *habitats* são as superfícies de tecidos de plantas, incluindo flores e frutas, muitas são aeróbias obrigatórias, embora outras sejam consideradas anaeróbias facultativas (BAMFORTH, 2005). Estes microrganismos são classificados em 90 gêneros e 770 diferentes espécies pertencentes às classes *Ascomycetes* e *Basidomycetes* e aquelas que não apresentam o ciclo sexual definido agrupada como fungos imperfeitos (KURTZMAN; FELL, 1998; FLEET, 2003).

A classificação das leveduras em gêneros e espécies é baseada em suas propriedades morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e mais recentemente, levam-se em considerações suas propriedades genéticas. A análise morfológica das colônias tem valor taxonômico para identificação das leveduras (KREJER-VAN Riji, 1984).

A classificação das leveduras em nível de gênero é baseada na presença ou ausência de uma fase sexual no ciclo de vida das leveduras. A reprodução assexuada por brotamento é a forma mais comum de reprodução das leveduras presentes nas uvas, mosto e vinho, que pode ser caracterizada pelo brotamento multilateral e polar. O brotamento polar pode ocorrer em único polo ou nos dois polos da célula, denominado bipolar. A reprodução sexual caracteriza-se pela formação de esporos sexuais designados de ascósporos e basidiósporos,

esta estrutura quando presente indica que as leveduras são telemorfos e a ausência às classifica em anamorfos ou assexuada (fungos imperfeitos), também conhecida como *Deuteromycetes* (FULGESANG; EDWARDS, 2007).

A fase sexual caracterizada pela formação de ascósporos muitas vezes não é percebida em laboratório, já que esses germinam rapidamente para produzir a levedura. Agentes químicos e físicos, a exemplo de alta concentração de glicose e temperatura respectivamente, podem impedir a formação dos ascósporos. Algumas espécies indígenas utilizadas no processo de vinificação se reproduzem por brotamento em um dos pólos ou em ambos os pólos, a exemplo da *Kloeckera* e *Saccharomyces*, que reproduzem-se por brotamento bipolar, dando origem à população de leveduras mais velhas de característica apiculada. As leveduras do gênero *Hanseniaspora* apresentam formas ovais ou ovóide, esférica (culturas jovens) e apiculadas (FULGESANG; EDWARDS, 2007). As leveduras apiculadas podem representar 50 a 99% da população total na superfície das uvas maduras e saudáveis (JOLLY; AUGUSTYN; PRETORIUS, 2003).

Os grupos de telemorfos e anamorfos apresentam uma estrutura celular complexa com diferentes organelas e com funções diferenciadas, contudo respondem de maneira similar as provas fisiológicas, como assimilação de compostos nitrogenados, diferentes fontes de carbono e fermentação de açúcares (BAMFORTH, 2005; FULGESANG; EDWARDS, 2007).

Em relação as necessidades nutricionais, as leveduras utilizam fonte de carbono reduzido (mono e dissacarídeos), nitrogênio, mineral e vitaminas (biotina, ácido pantotênico e tiamina) para o seu desenvolvimento. Os sais de amônio são prontamente utilizados assim como os compostos de nitrogênio orgânicos (aminoácidos e úreia). Crescem em ampla faixa de pH entre 1,5 a 9,3, sendo o ótimo entre 4,0 e 4,5. São mesófilas, crescem em temperatura de 25 a 28° C, reproduzem em até 18% de etanol e na presença de 33 a 60% de sacarose (BAMFORTH, 2005).

A membrana plasmática que delimita as células das organelas das leveduras é constituída de esteróis, ácidos graxos insaturados e proteínas, por este motivo é necessário o fornecimento de oxigênio, em pequenas quantidades para as leveduras sintetizarem esses precursores da membrana, mesmo quando

estão se desenvolvendo no processo fermentativo (FULGESANG; EDWARDS, 2007).

3 LEVEDURAS FERMENTATIVAS

Historicamente a microbiologia enológica esteve voltada para as leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, contudo o conhecimento atual indica que especialmente as leveduras não-*Saccharomyces*, que compõem a microbiota natural e presentes nas fases iniciais do processo de fermentação, podem influenciar positiva ou negativamente as propriedades organolépticas finais do vinho (PRETORIUS; WESTHUIZEN; AUGUSTYN, 1999). As leveduras não-*Saccharomyces* que integram os gêneros *Kloeckera*, *Cryptococcus*, *Torulaspota*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Zygosaccharomyces*, *Metschnikowia*, *Debaromyces*, *Issatchenkia* e *Rhodotorula* estão presentes na fase inicial da fermentação espontânea do mosto de uva (JOLLY; AUGUSTYN; PRETORIUS, 2006).

Para Perez-Gonzalez et al. (1993) a prática de inocular no mosto de uva cultivos puros de leveduras isoladas da microbiota natural das próprias regiões viníferas, asseguraria a tipicidade e a regionalidade do vinho produzido. Muitos estudos vêm produzindo evidências que estimulam o emprego desta prática enológica para produzir vinhos com propriedades sensoriais típicas da região. Neste sentido Jolly; Augustyn e Pretorius (2003), em experimentos realizados a partir da fermentação inoculada, reafirmam que a utilização de linhagens de leveduras não-*Saccharomyces* indígenas e *Saccharomyces* (cepa industrial) asseguram a produção de vinhos de qualidade. No entanto Capello et al. (2004), consideram que a qualidade do vinho está estritamente relacionada com a microbiota natural presente nas uvas, o que confere ao vinho características típicas e representativas de cada região vinífera e portanto adaptadas ao seu *habitat*.

As populações de espécies de leveduras, fungos, bactérias lácticas e acéticas que compõem a microbiota natural das uvas podem sofrer influência negativa de fatores externos a exemplo da quantidade elevada de chuvas antes da colheita, danos físicos que acometem as bagas, uso de fungicidas e condições inadequadas de manejo das plantas. O crescimento dessas populações de

microrganismos nas uvas antes da fermentação pode alterar a composição química do mosto, gerando produtos que afetam o subsequente crescimento das leveduras e as interações entre elas durante o processo fermentativo (FLEET; HEARD, 1993).

Em uvas maduras danificadas, nas quais existe maior disponibilidade de nutrientes e elevadas concentrações de açúcar, predominam tanto as leveduras com fraca capacidade fermentativa a exemplo das *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Candida* quanto as de alta capacidade fermentativa como a *Pichia* spp. Os microrganismos com alto potencial para deterioração a exemplo das *Zygosaccharomyces* spp, *Torulaspota* spp, bactérias ácidas acéticas como a *Gluconobacter* spp e *Acetobacter* spp também podem está presentes (BARATA; MALFEITO-FERREIRA; LOUREIRO, 2012).

Para Fleet (1992) as leveduras responsáveis pela fermentação alcoólica originam-se das superfícies das uvas, superfícies de equipamentos da vinícola e cultivos inoculados de *Saccharomyces*. As uvas têm sido consideradas a fonte primária de leveduras indígenas do vinho. Estas leveduras têm participação na vitivinificação por conduzirem a fermentação alcoólica. Leveduras não- *Saccharomyces* oxidativas deterioram o vinho durante a conservação nas barricas e após envase, além de afetar a qualidade do vinho por meio da autólise das leveduras.

O declínio progressivo da população de linhagens de leveduras não- *Saccharomyces* é observado á medida que avança o processo fermentativo. Este fenômeno é atribuído à baixa capacidade adaptativa do metabolismo da levedura devido ao aumento gradual da concentração de álcool uma vez que estas linhagens toleram concentrações de até 3-4% de etanol. Entretanto o aumento da concentração de álcool permite o crescimento de linhagens de *Saccharomyces*, as quais são álcool-tolerantes, osmotolerantes e resistem a baixa disponibilidade de oxigênio, conseqüentemente dominam e completam a fermentação alcoólica e mantêm sua atividade metabólica no estágio final da fermentação (RENOULF; STREHAIANO; LOVAUND-FUNEL, 2007; RODRIGUEZ et al., 2010).

Resultados de estudos realizados por Fleet e Heard (1993), indicaram que o mosto fresco de uva contém espécies de leveduras indígenas variadas que compõem a microbiota natural das uvas, dentre estas se destacam as não-

Saccharomyces dos gêneros *Hanseniaspora* (anamorfa *Kloeckera*), *Pichia*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces* que estão presentes em maior proporção e, uma minoria representada pelas *Saccharomyces*. Ocasionalmente podem estar presentes espécies de não-*Saccharomyces* pertencentes a outros gêneros como *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Torulaspora*, *Dekkera* e *Schizosaccharomyces*. Em estudos anteriores realizados por esses autores, constatou-se que em alguns casos, populações de *Hanseniaspora* persistiram ao longo do processo fermentativo do vinho, entretanto em menor nível que as *Saccharomyces cerevisiae* (HEARD; FLEET, 1985). Pesquisas similares realizadas por Ganga e Martinez (2004), avaliaram o perfil fermentativo das leveduras durante a fermentação do vinho e registraram que algumas linhagens de leveduras não-*Saccharomyces* completaram o processo fermentativo com 10-11% v/v de álcool.

O emprego de leveduras não-*Saccharomyces* de morfologia apiculadas, a exemplo da *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii* tornou objeto de interesse para muitos pesquisadores, particularmente porque são espécies frequentemente identificadas em uvas nas fases iniciais da fermentação (GIL et al., 1996; FLEET, 2003).

Resultados de estudos realizados por Romano et al. (2003) demonstraram que as leveduras apiculadas (não-*Saccharomyces*) apresentam propriedades enológicas positivas, sugerindo a adição destas durante o processo fermentativo do mosto de uva, aumentando, por conseguinte o aroma e sabor dos vinhos. Estudos similares foram realizados por Moreira et al. (2005) em que empregaram cultivo puros e mistos de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora guilliermondii* e *Hanseniaspora uvarum* na fermentação em meio de cultura simples e determinaram que a cinética do crescimento das leveduras apiculadas foi positivo, sendo assim estes autores sugeriram a utilização de culturas mistas de leveduras na fermentação do mosto de uva combinado com a tecnologia para produção de vinho com característica aromáticas diferenciadas.

Heard e Fleet (1993) e Lambrechts e Pretorius (2000) chamam atenção para o fato de muitas vinícolas utilizarem estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* no processo de fermentação para a produção do vinho, por apresentarem características fisiológicas diferenciadas das demais, tornando satisfatória para a

produção. Horsey (2007) relatou que as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus* por serem bem adaptadas aos processos fermentativos, têm ampla utilização na vinificação, as populações de células se mantêm viáveis durante as fases finais da fermentação, mesmo quando a concentração do açúcar é baixa e o conteúdo de etanol é alto (até 15% v/v), resistem a um baixo pH e temperatura alta e são mais tolerantes ao dióxido de enxofre que outras leveduras e bactérias.

Para Fleet (2003), Hierro et al. (2006) e Harsh(2009) a *Saccharomyces cerevisiae* é a principal levedura da fermentação alcoólica encontrada em níveis baixos nas uvas (50 UFC/g), vinhedos e no mosto não inoculado. Bisson (1999) sugere que o crescimento de leveduras indígenas, presentes na microbiota da uva, pode impactar significativamente na eficácia das *Saccharomyces cerevisiae* comerciais quando inoculadas no processo de fermentação e até mesmo inibir o crescimento normal desta levedura.

As características da duração das fases de crescimento populacional das leveduras no processo fermentativo sofrem influência de diversos fatores, dentre estes destacam-se as práticas de vinificação empregadas por algumas vinícolas para limitar o crescimento de microrganismos no mosto, a exemplo da adição de quantidades de nitrogênio assimilável e sulfito (acima de 80 mg/L) que ajuda a prevenir oxidação e deterioração do vinho, clarificação do mosto de uva, inoculação de leveduras selecionadas e interações destas com outros microrganismos (KHAN et al., 2000; SENER; CAMBAS; UNAL, 2007; HARSCH, 2009).

O crescimento da população de leveduras em mosto de uva fermentado segue padrão típico de cultivo em laboratório, sendo caracterizado pelas fases de adaptação (latência ou *lag*), exponencial (*log*), estacionária e de declínio celular. A Figura 1 representa o ciclo de crescimento das leveduras em condições padrão, durante a fermentação do mosto de uva. A fase inicial do ciclo de crescimento, fase de adaptação (letra a), representa o período em que as células de leveduras inoculadas no mosto se ajustam a um novo ambiente, em particular essas células estão respondendo às mudanças da pressão osmótica, apresentadas pelos altos níveis de açúcares do mosto, não ocorrendo aumento

populacional. Discreto aumento da população pode ser observado no final da fase de latência (DEL NOBILE et al., 2003).

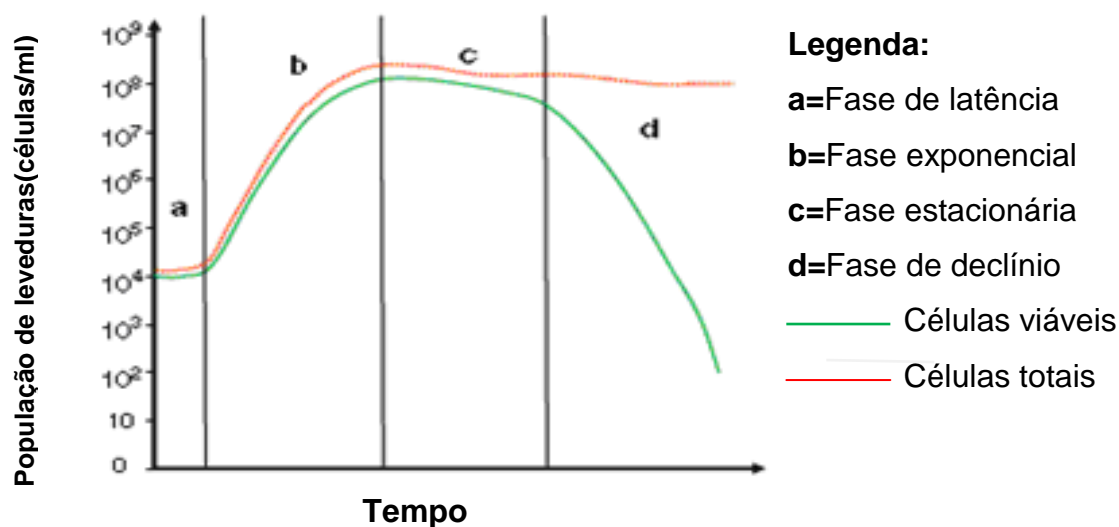


Figura 1. Ciclo de crescimento das leveduras (FLEET; HEARD 1993; DEL NOBILE et al., 2003)

Após a adaptação das leveduras às condições ambientais, tem início à fase de desenvolvimento celular, conhecida como fase exponencial ou logarítmica (fase *log*) (letra b), caracterizada pelo aumento populacional, nesta fase ocorre formação da população máxima de leveduras. Esta fase é influenciada pela temperatura, concentração de amônia, disponibilidade de aminoácidos, dentre outros nutrientes a exemplo de minerais e carboidratos (LAFON-LAFOURCADE, 1983; SABLAYROLLES et al., 1996), a presença do oxigênio também influencia(SABLAYROLLES; BARRE, 1986).

Durante a fase exponencial, as leveduras aumentam a população em até 10⁷-10⁸ células/mL. Nesta fase ocorre a produção máxima de etanol e pode durar de 3 a 6 dias. Depois deste período cessa o crescimento das leveduras, devido à escassez de alguns nutrientes (LAFON-LAFOURCADE et al., 1984; HORSEY, 2007). Posteriormente tem início à fase estacionária (letra c) que dura de 2 a 10 dias; nesta fase a população de leveduras se mantém estável. Após este período inicia-se a fase de declínio celular (letra d), a população de leveduras decresce gradativamente devido à falta de nutrientes, efeito tóxico do etanol, bem como síntese de outras substâncias oriundas do processo fermentativo que são tóxicas para as leveduras (LAFON-LAFOURCADE et al., 1984). Durante as

diferentes fases de crescimento celular, as leveduras usam a energia oriunda da adenosina trifosfato-ATP, esta energia é reduzida na forma de NADH e NADPH. Os carreadores de elétrons transportam a energia para manter o nível necessário para as funções celulares, bem como manter o balanço redox equilibrado (JACKSON, 2008).

As leveduras não-*Saccharomyces* participam da fermentação quando alcançam população de 10^6 – 10^7 células/ml, afetando assim tanto a cinética do crescimento quanto o desenvolvimento das leveduras *Saccharomyces*. A persistência das espécies de leveduras não-*Saccharomyces* durante o processo de fermentação irá depender de alguns fatores, a exemplo da temperatura do processo, pH do mosto, disponibilidade de nutriente para as leveduras, concentração de *Saccharomyces*, tipo e concentração de compostos antimicrobianos, sensibilidade à toxina “killer”; concentração de microrganismos indígenas presentes na fermentação do mosto e da tecnologia de processo o qual o mosto foi submetido (SATYANARAYANA; KUNZE, 2009).

A temperatura é um dos parâmetros mais importante que influencia no desenvolvimento das leveduras durante a fermentação alcoólica, podendo afetar tanto a cinética do processo quanto a qualidade final do vinho. Na vinificação a temperatura da fermentação varia de 12°C a 30°C. Essa faixa de temperatura é altamente dependente do tipo de vinho que é produzido como também das preferências culturais e regionais. Para o vinho tinto a temperatura de fermentação varia de 20 a 30°C, para vinhos brancos a temperatura normalmente é mais baixa, variando de 15 a 20°C (JACKSON, 2008; HARSCH, 2009). Temperaturas baixas durante a fermentação diminuem a velocidade de crescimento de leveduras, prolongando o processo fermentativo, e, dependendo da espécie de levedura empregada, há o risco do aumento da concentração de ácidos voláteis indesejáveis (TORIJA et al., 2003). Temperatura alta durante o processo fermentativo proporciona o aumento na produção de aromas voláteis ativos, a exemplo dos estéres, entretanto o processo tende a ser inibido progressivamente com aumento gradual do etanol e perda deste por evaporação. O caráter varietal de alguns vinhos brancos é melhor preservado em temperaturas mais baixas, por favorecer uma melhor retenção dos aromas (BAMFORTH, 2005; GÓES; ZANGIROLAMI, 2005).

O pH é outro fator que influencia diretamente no processo de fermentação do mosto de uva, este deve permanecer abaixo de 3,8 para manter a uniformidade do processo e reduzir a probabilidade de iniciar a fermentação malolática, favorecendo as propriedades sensoriais do vinho. O pH alto durante o processo fermentativo torna a capacidade do dióxido de enxofre (SO₂) menos inibitória para as leveduras indígenas. O pH pode ser reduzido a 3,25–3,35 pela adição de ácido tartárico (BAMFORTH, 2005).

Fleet (2008) considera importante compreender como as leveduras impactam na qualidade do vinho e desta forma a cinética da fermentação. Autores como Bisson (1999) e Zamora (2009) afirmam que o sucesso da fermentação depende da manutenção da população de leveduras viáveis em níveis suficientes até que todos os açúcares fermentáveis sejam completamente consumidos.

4 IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DE VINIFICAÇÃO

Os métodos convencionais empregados para isolamento e identificação das leveduras nas superfícies de uvas, no mosto, no vinho e no ambiente das vinícolas, são laboriosos e demorados. Dificuldades técnicas e metodológicas são também encontradas para a determinação do metabolismo ativo das células viáveis de leveduras não cultiváveis em amostras de vinho. Estas dificuldades são solucionadas com o desenvolvimento de métodos moleculares (MILLET; LONVAUND-FUNEL, 2000). Dentre os vários meios de cultura não seletivos utilizados para o isolamento de leveduras associados com a fermentação do vinho destaca-se o ágar suco de uva, ágar extrato de malte, ágar malte levedura (YM) e outros ágar nutrientes (FLEET et al., 1984).

Fleet (1992) considera os meios não seletivos ineficazes, devido à alta quantidade de leveduras que predomina no mosto de uva fermentado, dificultando assim a identificação de populações iniciais de espécies de leveduras. Assim sugere que meios de cultura seletivos sejam utilizados para que se consiga identificar as espécies existentes. Esse autor, juntamente com Heard (1986), apresentaram o meio de cultura seletivo ágar–lisina para o isolamento e enumeração de populações de espécies não-*saccharomyces* (exemplo, *Kloeckera apiculata* e *Candida stellata*) durante a fermentação do vinho.

Raspor et al. (2006) ao utilizarem o meio não seletivo Agar yeast malt (YM) isolaram 752 leveduras de três castas de uvas de diferentes variedades localizadas em cinco vinhedos na região da Slovenia. Clavijo, Calderón e Paneque (2010) utilizaram o meio não seletivo ágar extrato de levedura peptona dextrose (YEPD) e isolaram 1586 leveduras oriundas de mostos fermentados de uvas *Syrah* e *Merlot*. Li et al. (2010) utilizaram meios não seletivos e seletivos para o isolamento de leveduras, a exemplo de Agar Nutriente Wallerstein Laboratory (WL) e Agar etanol sulfito (ESA) respectivamente. O meio de cultura seletivo ESA foi utilizado para detectar a presença de espécies de *Saccharomyces*. Um total de 180 leveduras foi isolado a partir de 12 amostras de uvas de três cultivares *Cabernet sauvignon*, *Merlot* e *Chardonnay* de meio não seletivo, sendo que a população de leveduras *Saccharomyces* obtidas do meio de cultura seletivo (ESA) foi extremamente baixa.

Com o avanço da biologia molecular foi possível identificar leveduras industriais utilizando-se de métodos altamente sensíveis e permitiu também o controle eficaz das práticas de vinificação, tomada de decisões e prevenção da deterioração dos produtos finais (HIERRO et al., 2006).

Dentre os métodos moleculares utilizados para a identificação de leveduras presentes na microbiota das uvas, mosto e vinho, destacam-se a análise do DNA ribossomal que consiste na análise das subunidades 5.8S; 18S e 26S do RNA ribossomal, análise de restrição do DNA ribossomal e reação de polimerase em cadeia (PCR) em tempo real. A análise do DNA ribossomal consiste na comparação de sucessões de nucleotídeos de regiões do rDNA. As duas regiões comumente usadas são D1 e D2, que codificam as subunidades ribossomal 26S (KURTZMAN; ROBNETT, 1998) e 18S (JAMES et al., 1997). A análise de restrição baseia-se na amplificação da região 5.8S por meio da reação de polimease em cadeia (PCR), seguida da análise de restrição dos produtos amplificados. Esta técnica é utilizada para a diferenciação entre espécies. A técnica do PCR em tempo real é bastante utilizada, por ser altamente sensível e específica e permite monitorar os produtos da amplificação durante cada ciclo. Outros métodos são utilizados para diferenciar cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, os mais comuns são as técnicas de hibridização, polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP),

eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) dos cromossomos e análise de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) (FERNANDEZ-ESPINAR et al., 2011).

O PCR-DDGE (Reação de polimerase em cadeia de eletroforese em gel desnaturante de gradiente) é outro método molecular utilizado para identificação da biodiversidade de leveduras presentes nas uvas, mosto e vinho. Estudo realizado por Urso et al. (2008) utilizando esta ferramenta, possibilitou agrupar as leveduras previamente isoladas em meio de cultura não seletivo. Renouf, Strehaiano e Louvaund-Funel. (2007) ao estudarem leveduras e bactérias a partir de uvas durante a produção de vinho utilizaram a técnica de PCR-DDGE. Os autores identificaram complexos consórcios microbianos em todas as fases do processo de vinificação. Esta ferramenta possibilitou a comparação direta entre a microbiota presente no vinhedo, como também permitiu estabelecer uma conexão entre os diferentes microrganismos deterioradores e os defeitos que estes causavam nos vinhos.

Cocolin, Bisson e Mills (2000), Caruso et al. (2002) e Urso et al. (2008) afirmam que métodos moleculares se associam aos tradicionais para ampliar a possibilidade de estudar a dinâmica de populações de leveduras indígenas durante a fermentação espontânea do vinho, permitindo compreender de forma precisa as relações e interações entre diferentes espécies de leveduras envolvidas no processo fermentativo. A combinação dos testes moleculares com os tradicionais, a exemplo da determinação da taxa de crescimento, máximo de biomassa formada e tolerância ao etanol podem revelar como estas leveduras contribuem para a fermentação do mosto de uva (CHAROENCHAI; FLEET; HENSCHKE, 1998).

Os testes moleculares não discriminam entre células viáveis e mortas, contudo a tomada de decisão no processo fermentativo pode ficar comprometida, sendo assim é importante à seleção das leveduras que participam do processo de fermentação por métodos moleculares e validação da eficiência destas por meio de testes bioquímicos e fermentativos. KHAN et al. (2000) enfatizam que muitas pesquisas mostram que os métodos moleculares têm sido empregados como tentativas de identificar e selecionar as leveduras que melhor se adaptam ao

ambiente de fermentação e que contribuem positivamente ao processo fermentativo.

5 CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

As leveduras possuem maquinário genético para metabolizar açúcares por dois processos diferentes de obtenção de energia, aerobiamente (respiração) ou anaerobiamente (fermentação) (RACKER, 1974; BOULTON et al., 1996;) sendo que a principal via de metabolização do açúcar em condições de anaerobiose é a via glicolítica (GANCEDO, 1988; HORECKER, 2002).

O processo metabólico central na vinificação é a fermentação alcoólica, caminho catabólico que envolve a transformação dos principais açúcares D-glicose (dextrose) e D-frutose (levulose), em etanol e dióxido de carbono. As leveduras são as principais responsáveis por esta transformação. Às fontes de carbono, em particular os açúcares, permitem que as leveduras obtenham energia por meio da fermentação alcoólica (FA) (CASELLAS, 2005; ARANDA, MATAALLANA; OLMO, 2011). A fermentação alcoólica é considerada um processo metabólico complexo porque sintetiza uma série de produtos secundários responsáveis pelas características sensoriais do vinho (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000; ROMANO et al., 2003). O consumo inicial dos açúcares pelas leveduras na presença de oxigênio gera grandes quantidades de dióxido de carbono. A liberação de gás carbônico desloca o oxigênio e cria condições de anaerobiose que favorece a fermentação alcoólica (HORSEY, 2007).

A Fermentação alcoólica é integrada por três fases principais; transporte de açúcares para o interior da célula; transformação dos açúcares (glicose e frutose) em piruvato por meio da principal rota, a glicólise (via de Embden-Myerorf) e por último a descarboxilação do piruvato resultando em acetaldeído e CO₂. O acetaldeído é então reduzido a etanol por meio da enzima álcool desidrogenase regenerando o NAD⁺ (SATYANARAYANA; KUNZE, 2000; ZAMORA, 2009). A glicose-6-fosfato pode ser direcionada para a via da pentose fosfato, a qual resulta na formação NADPH (forma reduzida) e moléculas de ribose que é necessário para a biossíntese de ácidos graxos e nucleótidos existentes na célula das leveduras incrementando a síntese de biomassa celular (ARANDA, MATAALLANA; OLMO, 2011).

A produção de glicerol ocorre na fase inicial da fermentação alcoólica pela redução do dihidroxiacetona fosfato para glicerol-3-fosfato (G-3-P) (GARDNER et al., 1993). Quantitativamente é o mais importante produto da fermentação, seguido do etanol e do gás carbônico, sendo que o principal papel é equilibrar o potencial de oxido-redução intracelular. A depender da levedura, mosto e práticas de vinificação, 4 a 10% das fontes de carbono são convertidas em glicerol (ERASMUS; VAN VUUREN, 2009; ARANDA, MATALLANA; OLMO, 2011).

Durante a fermentação alcoólica as interações entre leveduras *Saccharomyces* e *não-Saccharomyces* ativam vários mecanismos bioquímicos entre os quais se destacam a degradação de proteínas e carboidratos, hidrólise enzimática dos componentes da uva, autólise das leveduras e bioadsorção e/ou produção de metabólitos que podem aumentar ou inibir multiplicação de outras leveduras presente no mosto fermentado. Tradicionalmente, as leveduras *Saccharomyces* são as principais espécies que desempenham a fermentação alcoólica do vinho e são amplamente selecionadas para serem utilizadas como cultura iniciadora (*starter*) do processo fermentativo, embora estudos venham sendo realizados para direcionar as *não-Saccharomyces* como culturas iniciadoras (FLEET, 2008).

Os mostos de uvas tinta e branca, especialmente aquelas de clima frio, sofrem fermentação secundária denominada de fermentação malolática (FML). Entretanto é mais frequente nos vinhos tinto do que nos branco, na presença do ácido málico. Esta fermentação é freqüentemente iniciada durante as fases finais da fermentação alcoólica e tem como objetivo reduzir a acidez total do vinho e elevar o pH, melhorando as características organolépticas do produto final (JACKSON, 2008). Durante este processo o ácido málico é convertido em ácido láctico e CO₂ pela ação de bactérias lácticas existentes no mosto de uva. O *Oenococcus lactis* é a principal bactéria responsável por esta fermentação (FLEET, 2001). As uvas de clima quente contêm menor quantidade de ácido málico, portanto os benefícios desta fermentação são maiores para as uvas de clima frio, onde a redução na acidez melhora as características do sabor do vinho (BAMFORTH, 2005; JACKSON, 2008).

6 AROMAS

O aroma e o sabor são uma das principais características que definem as diferenças entre os estilos de vinho em todo o mundo. As práticas de viticultura bem como de vinificação afetam estas características organolépticas (SWIEGERS, et al., 2005). Baseado na definição da química orgânica, o vinho é uma mistura complexa de inúmeros compostos, incluindo carboidratos, álcoois, aldeídos, ésteres, ácidos, proteínas e vitaminas. Também contém compostos aromáticos e cromáticos, a exemplo dos taninos, antocianinas e flavonóides que contribuem expressivamente para cor e sabor (HORNSEY, 2007).

A percepção do aroma e sabor do vinho pelo consumidor é o resultado da interpretação pelo sistema olfativo, a análise sensorial permite identificar e mensurar as características que agrada ao consumidor (STONE; SIDEL, 2004). Embora vários parâmetros sensoriais possam desempenhar papel na aceitação e prazer no consumo do vinho, é possível que o odor/aroma, sabor e a qualidade sensorial intrínseca do vinho sejam atributos importantes que influenciam a decisão de compra pelo consumidor (MARAIS, 1983; SWIEGERS; CHAMBERS; PRETORIUS, 2005).

Se os açúcares, ácidos e polifenóis fossem os únicos componentes da uva a contribuírem com o sabor e aroma, o vinho seria uma bebida relativamente sem atrativo. No entanto, existe uma gama de outros componentes, frequentemente voláteis que compõem o aroma, normalmente presentes em quantidade mínima que influenciam na variedade de estilos de vinho existentes no mercado. Os compostos voláteis são os mais importantes na formação do sabor e aroma (FIA; GIOVANI; ROSI, 2005; HORNSEY, 2007). Os microrganismos, especialmente as leveduras durante a fermentação também contribui positivamente para o aroma e sabor do vinho (FLEET, 2003).

A complexidade aromática dos vinhos varia de acordo com o aroma varietal, também conhecido como aroma primário, este é formado no interior das células da uva utilizadas na produção do vinho, aromas secundários, resultante do processo fermentativo pelo metabolismo das leveduras e bactérias lácticas e aromas terciários, formados a partir de reações químicas ou bioquímicas durante a maturação e envelhecimento do vinho em recipientes, a exemplo do barril de

carvalho (PISARNITSKII, 2001; MARKS, VAN DER MERWE; VAN VUUREN, 2003; HORSEY, 2007; HARSCH, 2009).

6.1 COMPOSTOS AROMÁTICOS DERIVADOS DA UVA

Os precursores de aroma presentes nas uvas ou compostos primários são substâncias não voláteis e relacionados com o carácter varietal do vinho. As uvas *Vitis viniferas* não tem aroma característico, exceto os monoterpenóides presentes na cultivar *Muscat* e 2-alkil-3-metoxipirazinas na *Cabernet sauvignon* (BAYONOVE, 1998). Os compostos não voláteis responsáveis pelo aroma primário ou derivado das uvas diferenciam os vinhos com base na variedade da casta empregada no processo de vinificação e na região vinífera (ARRHENIUS; MCCLOSKEY; SYLVAN, 1996; PARR et al., 2007). O aroma varietal do vinho é formado na pele ou exocarpa da baga da uva a exemplo dos monoterpenos, tióis voláteis, metoxipirazinas e norisoprenóides que contribuem para a tipicidade dos vinhos (KING, 2010).

-Metoxipirazinas. As metoxipirazinas são moléculas cíclicas que apresentam limiar de percepção olfativo extremamente baixo, são encontradas na forma de odores glicosilados, livres ou voláteis e são associados a aromas florais, relacionados ao vinho *Moscatél*. As três principais metoxipirazinas encontradas nas uvas são 2-isobutil-3-metoxipirazina (IBMP) e seu isômero estrutural 2-sec-butil-3-metoxipirazina (SBMP) e 2-isopropil-3-metoxipirazina (IPMP), sendo que a molécula IBMP é mais conhecida da família das pirazinas. O aroma produzido por esta molécula é responsável por notas herbáceas, como o aroma de pimentão verde, é conhecido como indicador de maturação das uvas e qualidade dos vinhos. O limiar de percepção é de 2 a 8 ng/L nos vinhos brancos e 2 a 16 ng/L nos tintos (HORSEY, 2007). Muitas das variedades de castas de uvas *Bordeaux*; *Cabernet Sauvignon* e *Merlot* contêm metoxipirazinas. O aroma produzido pela molécula IPMP são percebidos na casta *Cabernet sauvignon* (BAMFORTH, 2005).

-Terpenos e norisoprenóides. Os terpenos e norisoprenóides estão presentes na exocarpa das uvas, ambos nas formas livres ou ligadas, responsáveis pelos compostos aromáticos derivados das uvas. As formas ligadas são conjugadas às moléculas de açúcar, denominadas de glicoconjugados e são

hidrolisados por reações catalisadas pelas enzimas glicosidases (RIBEREAU-GAYON et al., 2006); sintetizadas nas próprias uvas, pelas leveduras e bactérias (KING, 2010). Os compostos terpenos e C₁₃-norisoprenoides determinam as notas frutadas ou florais para o aroma do vinho (GARDE-CERDÁN; ANCÍN-AZPILICUETA, 2006).

Álcoois de monoterpenos como citronelol, geraniol, linalool, terpineol e nerol compõem as uvas e são distribuídos no interior das células. Estão presentes especialmente nas castas *Vitis viníferas Moscato, Riesling, Gewurztraminer* e em outras variedades brancas, dando características de aroma frutal, estéres, picantes e vegetais. Porém, boa proporção destes terpenos de uva é covalentemente ligada à glicose, dissacarídeos de glicose e outros açúcares. Entretanto esta forma covalentemente ligada não exerce nenhum impacto sobre o sabor do vinho (RAPP; MANDERY, 1986). Esses álcoois determinam o sabor varietal de vinhos de qualidade jovens, elaborados a partir da variedade de uva *Muscat*, o geraniol e linalool são considerados os mais importantes alcóois de monoterpenos (MANZANARES et al., 2003). A transformação dos compostos terpenos presentes na uva e no vinho ocorre na produção e estocagem da uva e maturação dos vinhos (SIMPSON, 1979).

Os norisoprenóides estão presentes em concentrações variadas. A β -damascenona, particularmente é a variedade mais importante e contribui para o aroma de maçã (PINEAU et al., 2007)

-Tióis voláteis. Os compostos tióis expressam o caráter varietal frutado e vegetal. Estes compostos ocorrem nas formas não voláteis nas uvas e são ligados a L-cisteína e a glutatona. Durante a fermentação, as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus* sintetizam a enzima liase β -cisteína que libera os tióis na forma volátil (SWIEGERS et al., 2005; KING, 2010). No entanto o tiól mais importante e com limiar de percepção de 3 ng/L em vinho é o 4-mercapto-4-metilpentano-2-ona (4MMP) A presença dos tióis voláteis foi primeiro identificado em vinhos elaborados com *Vitis vinífera* cv. *Sauvignon blanc* (HOWEL et al., 2004).

6.2 COMPOSTOS AROMÁTICOS FORMADOS DURANTE A FERMENTAÇÃO PELA AÇÃO DE LEVEDURAS E BACTÉRIAS

Os compostos aromáticos sintetizados pelas leveduras e bactérias presentes no mosto de uva durante o processo fermentativo contribuem para formação do aroma do vinho. Enzimas como as glicosidases e liase cisteína estão envolvidas no processo de transformação bioquímica e são sintetizadas pelas leveduras. Vários fatores podem influenciar na composição do aroma, a exemplo da temperatura, teor de sólidos solúveis existentes no mosto de uva, microbiota que conduzem o processo fermentativo, dentre outros fatores (SWIEGERS et al., 2005).

O principal grupo de compostos aromáticos derivados do processo fermentativo é formado pelos ácidos orgânicos, alcoóis superiores, ésteres e em menor extensão os aldeídos (RAPP; VERSINI 1991).

-Ácido orgânico volátil. Os ácidos voláteis de cadeia curta de carbono representam a acidez volátil do vinho. O ácido acético normalmente constitui 90% destes ácidos e os demais são representados pelo propiônico e hexanóico, resultantes do metabolismo dos ácidos graxos presentes no mosto pela ação de bactérias e leveduras. O conteúdo de ácido volátil do vinho normalmente está entre 500 e 1000 mg/L (10–15% do ácido total) (RADLER, 1993). A elevada concentração do ácido acético confere caráter avinagrado ao vinho, então o ótimo de concentração está em torno de 0.2-0.7 g/L (DUBOIS, 1994). Os ácidos orgânicos têm o papel de estabilizar o mosto de uva fermentado e limitar o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis.

-Álcool. O etanol é o principal produto oriundo da conversão dos açúcares das uvas pelas leveduras. A presença do etanol é essencial para aumentar os atributos sensoriais dos componentes do vinho. Entretanto o excesso pode mascarar o aroma total do vinho e o sabor (GUTH; SIES, 2002). O glicerol presente nos vinhos é um poliálcool e não impacta diretamente nas características aromáticas, mas contribui para qualidade e características sensoriais, uma vez que proporciona sabor doce ao vinho (NOBLE; BURSICK, 1984). Alguns álcoois superiores ou fúsel álcool estão presentes nas uvas, mas não em nível significativo, a formação destes álcoois sofre influência direta do teor de nitrogênio total e conteúdo de aminoácidos presente no mosto de uva, aeração do mosto, pH, temperatura de fermentação, estirpe de levedura (FLEET; HEARD, 1993). As concentrações excessivas podem resultar em aroma forte e

pungente, entretanto níveis ótimos determinam caráter frutado ao vinho (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000; SWIEGERS et al., 2005).

-Éster. Os ésteres em vinhos são produzidos pelas leveduras, principalmente por meio do metabolismo dos lípidios e acetil-Coenzima A(CoA). A sua produção pode ser influenciada pela variedade da uva, já que as leveduras convertem os precursores de aroma primários inativos presentes na uva em aroma ativos, conferindo aroma floral e frutado ao vinho (SWIEGERS et al., 2005). Constitue o grupo de compostos que contribui para os aromas agradáveis do vinho (GIL et al., 1996). Há basicamente dois tipos de ésteres em vinho, os acetatos de álcoois superiores e o ésteres etílicos de ácidos graxos. O primeiro grupo é sintetizado a partir da condensação da acetil-coA e diferente álcoois superiores. O grupo de enzimas, envolvidas nestas reações são denominadas de álcool-acetil-coA-transferases (CORDENTE et al , 2007). Estes ésteres emitem odores diferentes no vinho, a exemplo do odor de banana (acetato de isoamila) ou rosa (acetato de pheniletanol) (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000).

Os ésteres etílicos de ácido graxos (butirato de etil, hexanoato de etil, octanoato de etil e decanoato de etil), são sintetizados a partir da ativação do ácido graxo pela coA. Esta reação é catalizada pela enzima acil-CoA sintetase (SWIEGERS et al.,2005). As leveduras não-*Saccharomyces* contribuem significativamente na formação de ésteres (ROJAS et al., 2003). Estudos desenvolvidos por Jolly; Augustyn e Pretorius (2006) determinaram que a *Pichia anomala*, *Kloeckera apiculata* e *Candida pulcherrim* são conhecidas pela alta produção de ésteres.

-Aldeídos. O acetaldeído representa aproximadamente 90% dos compostos carbonil encontrados nos vinhos, têm limites aceitáveis de 100 mg/L. São gerados a partir de dois cetoácidos derivados da síntese ou degradação de aminoácidos ou álcoois superiores (ARANDA; MATAALLANA; OLMO, 2011). É um dos principais metabólitos intermediários na fermentação do mosto de uva pelas leveduras, sintetizado antes do etanol. Quando presente em concentrações aceitáveis pode contribuir para a complexidade de aroma (SWIEGERS et al., 2005). O aldeído presente no vinho oriundo do processo fermentativo confere aromas que podem indicar sinais de oxidação, a exemplo do aroma de “maçã deteriorada” e “nozes”. É de grande importância o controle do processo

fermentativo, em particular da temperatura, para que não ocorra a produção de aromas indesejáveis, comprometendo a qualidade final do produto (ZAMORA, 2009).

6.3 COMPOSTOS AROMÁTICOS FORMADOS A PARTIR DO PROCESSO DE ENVELHECIMENTO VINHO

Após o término da fermentação alcoólica ou malolática, os vinhos podem ser envelhecidos dentro de barris de madeira (carvalho), por um determinado período. Durante o processo de envelhecimento do vinho, a produção do aroma é influenciada pelo tipo e tamanho dos barris de carvalho, período de armazenamento e outros fatores. Mudanças nas condições ambientais no interior do barril podem ocorrer e favorecer o desenvolvimento de microrganismos oxidativos indesejáveis resultando em aroma desagradável (FUGELSANG; EDWARDS, 2007).

Os compostos aromáticos do vinho derivados da uva e da ação de leveduras e bactéria são geralmente modificados pelas reações químicas que ocorrem durante o processo de envelhecimento do vinho (SINGLETON, 2000). Alguns monoterpenos podem decrescer ou aumentar a sua concentração durante o envelhecimento, assim como os norisoprenóide, outro composto aromático derivado da uva que também contribui para formação do aroma na fase de envelhecimento (WINTERHALTER, 1991).

O tanino, derivado dos barris de carvalho é considerado o composto mais importante na fase de envelhecimento, proporciona ambiente de baixo potencial redox incrementando o consumo de oxigênio devido às reações químicas que ocorrem na matriz do vinho, conduzindo assim a formação de peróxidos e acetaldeído (VIVAS; GLORIES, 1996). Os aldeídos conferem ao vinho envelhecido aroma de café torrado, madeira e amanteigado. Outro composto aromático a exemplo dos ésteres de acetato reduz em concentração durante o envelhecimento, conferindo ao vinho baixo limiar de percepção de aroma frutal. Os alcoóis superiores e ácidos orgânicos também presentes são relativamente estáveis durante o envelhecimento (HORSEY, 2007).

REFERÊNCIAS

ARANDA, A.; MALLANA, E.; OLMO, M. LD. Saccharomyces Yeasts I: Primary Fermentation. In: CARRASCOSA, A.V. MUNÓZ, R.; GONZÁLEZ, R.N. **MOLECULAR WINE MICROBIOLOGY**.Elsevier. 2011. chapter 1. p. 2-23.

ARRHENIUS, P.; MCCLOSKEY, L. P.; SYLVAN, M. Chemical Markers for Aroma of *Vitis vinifera* Var. *Chardonnay* Regional Wines.**Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.44, n.4, p-1085-1090, 1996.

BAYONOVE, C. **Efeito dos fatores ambientais nos aromas varietais da uva**. In:Seminário Franco-Brasileiro de Viticultura, Enologia e Gastronomia, 1998, BentoGonçalves. Anais. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1998. p. 31-44.

BAMFORTH, C.W. The Science Underpinning Food Fermentations. In:_____ . **Food, Fermentation and Micro-organisms**. Blackwell Science Ltd , 2005.chapter 1.p.1-38.

BAMFORTH, C.W. The Science Underpinning Food Fermentations. In:_____ **Food, Fermentation and Micro-organisms**. Blackwell Science Ltd , 2005.chapter 3.p.89-105,

BARATA A.; MALFEITO-FERREIRA M.; LOUREIRO, V. The microbial ecology of wine grape berries. **International Journal of Food Microbiology**, v.153, n.3, p.243–259, 2012.

BISSON, L.F. Stuck and sluggish fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, n. 1, p.107-119.1999.

BOULTON, R.B.; SINGLETON, V.L.; BISSON, L.F. KUNKEE, R.E. Yeast and biochemistry of ethanol fermentation. In: BOULTON, R.B. **Principles and Practices of Winemaking**, p.139–172, 1996.

CAMARGO, U. A. Variedade de uva. In: GUERRA, C.C.; MANDELLI, F.; TONIETTO, J.; ZANUS, M. C.; CAMARGO, U. A. **Conhecendo o essencial sobre uva e vinhos**. Embrapa Uva e Vinho. Bento Gonçalves, 2009.p. 39-46.

CAPELLO, M.S.; BLEVE, G.; GRIECO, F.; DELLAGLIO, F.; ZACHEO, G. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p. 1274-1280, 2004.

CARNEIRO, W. M. A.; COELHO, M. C. S. G. **A Vitivinicultura no Nordeste Brasileiro: Características e Perspectivas da atividade para a região**. In: XLV CONGRESSO DA SOBER "Conhecimentos para Agricultura do Futuro", 2007, Londrina. 21p.

CARUSO, M.; CAPECE, A.; SALZANO, G.; ROMANO, P. Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. **Letters in Applied Microbiology**, v.34, n.5, p.323-328, 2002.

CASELAS, G.M. **Effect of low temperature fermentation and nitrogen content on wine yeast metabolism**. 2005, 240p. Per optar al grau Doctora per la Universitat Rovira I Virgili. Tarragona.

CHAROENCHAI, C.; FLEET, G.H.; HENSCHKE, P.A.; TODD, B.E.N. Screening of non-*Saccharomyces* yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 3, n. 1, p.2–8, 1997.

CLAVIJO, A.; CALDERÓ, I. L.; PANEQUE, P. 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**, v. 143, n.3, P.241-245, 2010.

COCOLIN, L.; BISSON, L. F.; MILLS, D. A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology Letters**, v. 189, n.1, p.81-87, 2000.

CORDETE, A.G.; SWIEGERS, J.H.; HEGARDT, F.G.; PRETORIUS, I.S. Modulating aroma compounds during wine fermentation by manipulating carnitine acetyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 267, n. 2, p.159–166, 2007.

DEL NOBILE, M.A.; D'AMATO, D.; ALTIERI, C.; CORBO, M.R.; SINIGAGLIA, M. Modeling the yeast Growth-Cycle in a model wine system. **Journal of Food Science**, v. 68, n.6, p. 2080–2085, 2003.

DUBOIS, P. Les arômes des vins et leurs défauts (wines aromas and their defects) **Revue Française d'oenologie**, v.145, p.27-40, 1994.

ERASMUS, D.J.; VAN VUUREN, H.J.J. Genetic Basis for Osmosensitivity and Genetic Instability of the Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae* VIN7. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 60, n.2, 2009.

FERNANDEZ-ESPINAR, M.T.; LLOPIS, S.; QUEROL, A.; BARRIO, E. Molecular Identification and Characterization of Wine Yeasts. In: CARRASCOSA, A.V. MUNÓZ, R.; GONZÁLEZ, R.N. **Molecular Wine Microbiology**. Elsevier, 2011. chapter 5. p. 111-129.

FIA, G.; GIOVANI, G.; ROSI, I. Study of b-glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. **The Society for Applied Microbiology. Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 509–517. 2005.

FLEET, G. H.; LAFON-LAFOURCADE, S.; RIBEREAU-GAYON, P. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, n. 5, p.1034-1038, 1984.

- FLEET, G.H. Spoilage yeasts. **Critical Review in Biotechnology**, v. 12, n. (1-2), p.1-44, 1992.
- FLEET, G.H.; HEARD, G.M Yeast-growth during fermentation. In: FLEET, G.H. **Wine Microbiology and Biotechnology**, Harwood Academic Publishers, 1993.Chapter. 2. p. 27–54.
- FLEET, G.H. Wine. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**, ASM Press, Washington, p. 747–772, 2001.
- FLEET, G.H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, n (1-2), p. 11 – 22, 2003.
- FLEET, G.H. Wine yeasts for the future. **FEMS Yeast research**, v.8, n.7, p.979–995.2008.
- FUGELSANG, K.C., EDWARDS, C.G. **Wine Microbiology:Practical Applications and Procedures**. Second edition. Springer, 2007, 380p
- GANCEDO, J.M. La regulation du metabolisme des sucres chez la levure. In: BIDAN, P.; BONNEVIALE, J.R. **Application `a l'oenologie des progrès récents en microbiologie et en fermentation**, p. 133–143, 1988.
- GANGA, M.A.; MARTINEZ C. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-Saccharomyces yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, n. 1, p. 76-83, 2004.
- GARDE-CERDÁN, T.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Contribution of wild yeasts to the formation of volatile compounds in inoculated wine fermentations. **European Food Research Technology**, v. 222, n. (1-2), p.15–25, 2006.
- GARDNER, N.; RODRIGUE.;N.;CHAMPAGNE, C P. Combined effects of sulfites,temperature,and agitation time on production of glycerol in grape juice by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, n.7, p.2022-2028, 1993.
- GIL,J.V.;MATEO,J.J.;JIMENEZ,M.;PASTOR,A.;HUERTA,T.Aroma compounds in wines as influenced by apiculate yeasts. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 1247-1250, 1996.
- GÓES, F.J.; ZANGIROLAMI, T.C. Otimização das Condições de Fermentação para a Produção de Vinho Proveniente da Uva Variedade "Itália". **Brazilian Journal of Food Technology**, p.14-23, 2005.
- GUTH, H.; SIES, A. Flavour of wines: towards an understanding by reconstitution experiments and an analysis of ethanol's effect on odour activity of key compounds. **Australian Wine**, p.128-139, 2002.

HEARD, G.M.; FLEET, G.H. Growth of natural yeast Flora during the fermentation of inoculated wines. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50,n.3, p. 727-728, 1985.

HEARD, G. M.; FLEET, G. H. Evaluation of selective media for enumeration of yeasts during wine fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 477–488, 1986.

HARSCH, M.J. **Identification of yeast genes involved in sauvignon blanc aroma development**. 2009, 207p. Thesis was submitted in fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Biological Sciences-University of Auckland.

HIERRO, N.; GONZÁLEZ, A. MAS, A.; GILLAMÓN, J.M. Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations' during wine fermentation effect of grape ripeness and cold maceration, **FEMS Yeasts research**, v.6, n.1,p.102-111, 2006.

HIERRO, N.; ESTEVE-ZARZOSO, B.; GONZÁLEZ, A.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J.M. Real-Time Quantitative PCR (QPCR) and Reverse Transcription-QPCR for Detection and Enumeration of Total Yeasts in Wine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.11, 2006.

HORECKER, B.L.The Pentose Phosphate Pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n.50, p.47965–47971, 2002.

HORSEY, I. **The Chemistry and Biology of Winemaking**. RCS Publishing, 2007.436p.

HOWELL, K.S.; SWIEGERS, J.H.;ELSEY, G.M.; SIEBERT, T.E., BARTOWSKY, E.J.;FLEET, G.H.; PRETORIUS, I.S.;BARROS LOPES, M.A.Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. **FEMS Microbiology Letters**, v.240, n.2, p. 125–129, 2004.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: **Pesquisa Agrícola Municipal (PAM)** do IBGE. IBGE, 2006. Disponível em<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=740> Acesso em 8/5/2012.

IBRAVIN-Instituto Brasileiro do Vinho. **Regiões produtoras de vinho**. Bento Gonçalves, 2010. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/regioesprodutoras.php>> Acesso em 8/11/2011.

JACKSON, R. S. **Wine Science: Principles, Practice, Perception**. San Diego, Third edition, Academic Press, 2008.702p.

JAMES, S. A.; CAI, J.; ROBERTS, I. N.; COLLINS, M. D. (1997). A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces*

martiniae sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, n.2, p. 453-460

JOLLY, N.P.; AUGUSTYN O.P.H.; PRETORIUS I.S.. The Effect of Non-*Saccharomyces* Yeasts on Fermentation and Wine Quality. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 24, n. 2, p.55-62, 2003.

JOLLY, N.P.; AUGUSTYN O.P.H.; PRETORIUS I.S. The Role and Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production., **South African Journal of Enology and Viticulture**, v.27, n. 1,p.15-39, 2006.

JUBILEU, B.S.; SATO, A.J.; ROBERTO, S. R. Caracterização fenológica e produtiva das videiras 'cabernet sauvignon' e 'alicante' (*vitis vinifera* L.) produzidas fora de época, no norte do Paraná. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 451-462, 2010.

KHAN, W.; AUGUSTYN, O. H. P.; van der WESTHUIZEN, T. J.; LAMBRECHTS, M. G.;PRETORIUS,I.S. Geographic distribution and evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the warmer, inland regions of the Western Cape in South Africa. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, n. 1, p. 17-31, 2000.

KING, E.S.;KIEVT,R.L.;CUTIN, C.SWIEGERS, J.H.;PRETORIUS, I.S.;BASTIAN, S.E.P.;FRANCIS, I.L.The effect of multiple yeasts co-inoculations on Sauvignon blanc wine aroma composition, sensory properties and consumer preference.**Food chemistry**, v.122, p.618-626, 2010.

KREJER-van Riji, N.J.W. **Delimitation of the yeasts**. In: N.J.W. Kreger-van Riji. The Yeasts, A Taxonomic Study, third edition. Elsevier, Amsterdam, p. 1-16. 1984.

KURTZMAN, C.P; FELL, J.W. **The Yeast: A Taxonomic study**. Amsterdam. Elsevier,1998. 1016p.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) Ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.73, n.4, p.331-371, 1998.

LAFON-LAFOURCADE, S. Wine and brandy. Biotechnology, In: REHM, H.J.; REED, G.**Food and Feed Production with Microorganisms**, v.5, p. 81–163, 1983.

LAFON-LAFOURCADE,S.; GENEIX, C.;RIBEREAU-GAYON,P. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.47, n.6 p.1246–1249, 1984.

LAMBRECHTS, G.M.; PRETORIUS, I.S.Yeasts and its Importance to wine Aroma- A Review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v.21, p. 92-129, 2000.

- LI, S.S., CHENG, C., LI, Z., CHEN, J.Y., YAN, B., HAN, B.Z., REEVES, M. Yeast species associated with wine grapes in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, n (1-2), p. 85–90, 2010.
- MANDELLI, F., ZANUS, M. C. O clima e a safra vinícola. In: GUERRA, C.C., MANDELLI, F. TORNIETTO, J., ZANUS, M.C., CAMARGO, U.A. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. Embrapa, 2009. p.31-34.
- MANZANARES, P.; OREJAS, M. GIL, J.V.; GRAAFF, L.H.; VISSER, J.; RAMÓN, D. v Construction of a Genetically Modified Wine Yeast Strain Expressing the *Aspergillus aculeatus rhaA* Gene, Encoding an α -L-Rhamnosidase of Enological Interest. . **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 12, p.7558–7562, 2003.
- MARAIS, J. Terpenes in the Aroma of Grapes and Wines: A Review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v.4, n.2, p.49-58, 1983.
- MARKS, V.D.; VAN DER MERWE, G.K., VAN VUUREN, H.J.J. Transcriptional profiling of wine yeast in fermenting grape juice: regulatory effect of diammonium phosphate. *FEMS Yeast Research*, v. 3, n. 3, p. 269-287, 2003.
- MILLET, V.; LONVAUND-FUNEL, A. The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. **Letters in Applied Microbiology**, v.30, n.2, p.136-141, 2000.
- MIOLO, A. **Vinho de clima tropical**. In: X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia: Novas regiões. Bento Gonçalves, RS. 2003, 141p.
- MOREIRA, N.; MENDES, F. HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v.103, n.3, p.285-294, 2005.
- NOBLE, A. C.; BURSICK, G. F. The contribution of glycerol to perceived viscosity and sweetness in white wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 35, p.110-113, 1984.
- PARR, W.V.; GREEN, J.A.; WHITE, K.G.; SHERLOCK, R.R. The distinctive flavour of New Zealand Sauvignon blanc: Sensory characterisation by wine professionals. **Food Quality and Preference**, v.18, n.6, p.849-861, 2007.
- PEREIRA, G.E. **Notas técnicas**. p.1-5, 2007. Disponível em www.vinhovasf.com.br/site/arquivos/notastécnicas.pdf. Acesso em: 13/05/12.
- PRETORIUS, I.S.; WESTHUIZEN van der J.J.; AUGUSTYN, O.P.H. Yeasts Biodiversity in Vineyards and Wineries and Its importance to the South African wine industry. **South African Journal Enology Viticulture**, v.20, n.2, p. 61-74, 1999.
- PÉREZ- GONZALEZ, J.A.; GONZÁLEZ, R.; QUEROL, A.; SENDRA, J.; RAMÓN, D. Construction of a recombinant wine yeast strain expressing β -1,4-

endoglucanase and its use in microvinification processes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n.9, p. 2801-2806, 1993.

PINEAU, B.; BARBE, J.C.; LEEUWEN, C.V.; DUBOURDIEU, D. Which Impact for β -Damascenone on Red Wines Aroma? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n.10, p. 4103–4108, 2007.

PISARNITSKII, A. F. Formation of wine aroma: tones and imperfections caused by minor components (Review). **Applied Biochemistry Microbiology**, v.37, n.6, p. 552–560, 2001.

RACKER, E. History of the Pasteur effect and its pathobiology. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 5, n.(1-2), p. 17–23, 1974.

RADLER, F. Yeasts – metabolism of organic acids. In FLEET, G.H. **Wine Microbiology and Biotechnology**. Harwood Academic Publishers, chapter 5, p. 165–182, 1993.

RAPP, A.; MANDERY, H. Wine aroma. **Experientia**, v.42, p. 873-884, 1986.

RAPP, A.; VERSINI, G. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wine. In: RANTZ, J, M. Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines. Davis, CA: **American Society for Enology and viticulture**, p.156-164, 1991.

RASPOR, P.; MILEK, D.M.; POLANC, J.; MOZINA, S.S.; ČADEZ, N. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, p. 97–102, n.(1-2), 2006.

RENOULF, V.; STREHAIANO, P.; LOVAUND-FUNEL, A. Yeast and bacteria analysis of grape, wine and cellar equipments by PCR-DGGE. **International Journal of Vine and Wine Sciences**, v. 41, n.1, p.51-61, 2007.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÉCHE, B.; LONVAUD, A. **Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications**. John Wiley & Sons Ltd. Second edition, v.1, 481p, 2006.

RODRÍGUEZ, M.E.; LOPES, C.A.; BARBAGELATA, R.J.; BARDA, N.B.; CABALLERO, A.C. Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, n. (1-2), p.19-25, 2010.

ROJAS V.; GIL, J.V.; PINAÑA, F.; MANZANARES, P. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, n. (1-2), p.181-188, 2003.

ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, n. (1-2), p. 169–180, 2003.

SABLAYROLLES, J.M.; BARRE, P. Evaluation des besoins en oxygen de fermentations alcooliques en conditions oenologiques silées. **Sciences des aliments**, v.6, p.373–383, 1986.

SABLAYROLLES, J.M.; DUBOIS, C.; MANGINOT, C.; ROUSTAN, J.L.; BARRES, P. Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, n. 4, p. 377–381, 1996.

SATYANARAYANA, T.; KUNZE, G. **Yeast Biotechnology: Diversity and Applications**. Springer, 2009. p 3-715.

SENER, F.; CAMBAS, A.; UNAL, M.U. The Effect of Fermentation Temperature on the Growth Kinetics of Wine Yeast Species. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v.31, p.349-354, 2007.

SIMPSON, R.F. Some important aroma components of white wine. **Food Technology Australia**, v. 31, p.516–522, 1979.

SINGLETON, V.L. A Survey of wine aging reactions, especially with oxygen. Proceedings of the 50th Anniversary Annual Meeting of the American Society of Enology and Viticulture, Seattle, Washing, **American Society of Enology and Viticulture**, p. 323-336, 2002.

SOARES, J.M. LEÃO, P.C.S. **A Vitivinicultura no Semiárido Brasileiro**. Embrapa, 2009, 756p.

STONE, H.; SIDEL, J. L. Descriptive Analysis. In: STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**, Academic Press, 2004.p. 215-235.

SWIEGERS, J.H.; BARTOWSKY, E.J.; HENSCHKE, P.A.; PRETORIUS, I.S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.11, p.139-173,2005a.

SWIEGERS, J.H.; CHAMBERS, P.J.; PRETORIUS, I.S. Olfaction and taste: Human perception, physiology and genetics. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.11, n. 2, p.109-113, 2005.

TORIJA, M. J.; BELTRAN, G.; NOVO, M.; POBLET, M.; GUILLAMÓN, J.M.; MAS, A.; ROZÉS, N. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. **International Journal of Food Microbiology**, v.85, n. (1-2), p. 127– 136 2003.

URSO, R.; RANTSIOU, K.; DOLCI, P.; ROLLE, L.; COMI, G.; COCOLIN, L. Yeast biodiversity and dynamics during wine production as determined by molecular methods. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n.7, p.1053–1062, 2008.

VIVAS, N.; GLORIES, Y. Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.47, p.103-107, 1996.

WINTERHALTER, P. 1, 6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) formation in wine. 1 Studies on the hydrolysis of 2, 6, 10, 10-tetramethyl-1-oxaspiro-[4, 5]-dec-6-ene-2,8-diol rationalizing the origin of TDN and related C13 norisoprenoids in *Riesling* wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, n.10, p. 1825–1829, 1991.

ZAMORA, F. Biochemistry of Alcoholic Fermentation. In: MORENO, M.V.A.; POLO, M.C. **Wine Chemistry and Biochemistry**, Springer, chapter 1. p 3-26.

CAPÍTULO II

LEVEDURAS DE UVAS *VITIS VINIFERA* L. DE REGIÃO EQUATORIAL.

RESUMO

O Vale do Submédio São Francisco é uma das regiões mais promissoras na produção de vinho no Brasil, está localizada nos estados da Bahia e Pernambuco. Ainda é desconhecido se a região pode produzir vinhos por fermentação espontânea e gerar um produto com características típicas regionais. Sabe-se que as leveduras não-*Saccharomyces* desempenham papel importante no processo de fermentação espontânea e determinam características específicas no vinho. Baseado nessas informações, este estudo teve como objetivo isolar e identificar leveduras segundo o gênero, predominante em uvas frescas *Vitis vinifera* L. cultivadas na região do Vale do Submédio São Francisco (BA/PE). As leveduras foram isoladas usando meio Agar Yeast Malt (YM). Os isolados foram identificados com base nas características morfo-fisiológicas, habilidade de crescimento em meio de cultura agar L-lisina (seletivo para leveduras não-*Saccharomyces*) e identificação bioquímica, baseando-se em testes fisiológicos (habilidade de fermentação da glicose, assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, osmotolerância e termotolerância). Um total de 60 isolados de leveduras foi obtido no meio agar YM e todos pertencentes ao grupo não-*Saccharomyces*. Os testes fisiológicos mostraram que 20 das 60 leveduras isoladas não foram agrupadas em nenhum gênero. Entretanto 40 dessas leveduras foram sugestivos de serem pertencentes ao gênero *Hanseniaspora* spp. Destas 40, 17 foram identificadas até a espécie, sendo sugestivas de *Hanseniaspora guilliermondii* (anamorfo *Kloeckera apis*). Desta forma conclui-se que a microbiota da casca das uvas cultivadas da região do Vale do Submédio São Francisco é predominada por leveduras não-*Saccharomyces*, especificamente do gênero *Hanseniaspora* spp.

Palavras-chaves: Identificação bioquímica, *Vitis vinifera* L., Leveduras, *Hanseniaspora*, Vale do Submédio São Francisco.

ABSTRACT

The São Francisco Submid Valley is one of the most promising regions in wine production in Brazil, is located in the States of Bahia and Pernambuco. It is still unknown if the region can produce wine by spontaneous fermentation and generate a product with typical regional characteristics. It is known that the yeasts *non-Saccharomyces* play an important role in the process of spontaneous fermentation and determine specific characteristics in the wine. Based on these information, this study aimed to isolate and identify yeasts according to the predominant genus of fresh grapes *Vitis vinifera* L. cultivated in the Valley of the São Francisco Submid, Brazil. Yeasts were isolated using the Agar Yeast Malt (YM) medium. The isolates were identified based on morpho-physiological characteristics, growth ability in culture medium L-lysine agar (selective for *non-Saccharomyces* yeasts) and biochemical identification, based on physiological tests (glucose fermentation ability, assimilation of carbon and nitrogen sources, osmotolerance and thermotolerance). A total of 60 isolated yeasts were obtained in the YM agar medium and these all belonging to the *non-Saccharomyces* group. Physiological tests showed that 20 of the 60 yeasts isolated colonies were not grouped into any genre. However 40 of these yeasts were suggestive belonging to the *Hanseniaspora* spp gender. Of these 40, 17 were identified even the species, being suggestive of *Hanseniaspora guilliermondi* (*Kloeckera apis* anamorph). Thus we conclude that the microbiota shell grapes grown on São Francisco Submid Valley region is predominated by *non-Saccharomyces* yeasts, specifically the *Hanseniaspora* spp gender.

Keywords: Biochemistry Identification, *Vitis vinifera* L., Yeasts, *Hanseniaspora*, São Francisco Submid Valley.

1 INTRODUÇÃO

O Vale do Submédio São Francisco está localizado entre 8º e 9º de latitude sul, e é a região mais próxima da linha do equador em todo o mundo. Atualmente, há nesta região uma área equivalente a 700 hectares de parreiras com cultivares que dão origem a aproximadamente 7 milhões de litros de vinho por ano, sendo 80 e 20 % destinado a produção de vinho tinto e branco, respectivamente (SILVA; CORREIA; SOARES, 2009).

Fleet (2008) relata em sua revisão que: há concorrência internacional no mercado do vinho, demanda dos consumidores por novos estilos de vinhos, preocupações crescentes sobre os impactos ambientais da produção de vinho, e que isto tudo contribui para a busca de novos desafios para a inovação na tecnologia de produção de vinho.

A fermentação espontânea do vinho é um processo complexo que dá origem a diferentes compostos que definem a qualidade do produto. O processo de fermentação pode ser conduzido por leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, sendo que o papel de diferentes linhagens de não-*Saccharomyces* na fermentação tem sido muito estudado (FLEET, 2003). Pesquisas têm sido realizadas no sentido de explorar o potencial das leveduras não-*Saccharomyces*, na sua contribuição na formação do aroma e sabor do vinho, podendo dar origem a um produto diferenciado e com características específicas regionais (PRETORIUS; WESTHUIZEN; AUGUSTYN, 1999; BISSON et al., 2002). Ganga e Martinez (2004), estudando a biodiversidade de leveduras indígenas na produção de vinho, identificaram leveduras não-*Saccharomyces* no final do processo de fermentação, quando o teor alcoólico do vinho apresentava 10-11%, verificando assim que as leveduras tinham potencial para serem utilizadas em processos industriais de produção de vinhos.

Estudos demonstram que as leveduras não-*Saccharomyces* apiculadas a exemplo da *Hanseniaspora uvarum* e sua forma anamórfica, *Kloeckera apiculata*, bem como a *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Kluyveromyces* são predominantes nas superfícies de uvas (FLEET; HEARD; 1993).

A técnica convencional de identificação morfológica e bioquímica/fisiológica, quando realizada adequadamente pode ser uma ferramenta útil de alto grau de confiança. Estas análises podem ser empregadas

para se chegar à conclusão ao nível de gênero pelo agrupamento das leveduras (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; BARATA; MALFEITO- FERREIRA; LOUREIRO, 2012).

A produção de uvas fora das tradicionais zonas temperadas merece estudo, pois pode se mostrar com potencial para produção de vinhos típicos regionais e criar oportunidades de desenvolvimento social, econômico e tecnológico. Diante do exposto, nosso objetivo foi isolar e identificar leveduras, segundo o gênero, predominante em uvas frescas cultivadas na região do Vale do Submédio São Francisco (BA/PE), visando à possibilidade da utilização destas em processos biotecnológicos e produção de vinho.

2 MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia de Alimentos do Departamento de Análises Bromatológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia- UFBA em parceria com o Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Leveduras do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

2.1 MATERIAL

2.1.1 Amostras

As amostras de uvas utilizadas neste estudo foram compostas de cultivares brancas e tintas da variedade *Vitis vinifera* L., cultivadas nos municípios de Casa Nova (Bahia), 380 metros de altitude, latitude Sul 09°05'00" e longitude 40°37'00"(VIEIRA et al., 2005); Lagoa Grande (Pernambuco), 361 metros de altitude (IBGE,2011) , 8°59'47" de latitude Sul e longitude 40°16'18"(IBGE, 2006) e Santa Maria da Boa Vista (Pernambuco) 371 de altitude(IBGE, 2011), latitude Sul 8°47'58" e longitude 39°49'39"(IBGE, 2006), compreendendo uma raio de 200km de distância entre os locais de coleta. As uvas tintas utilizadas foram: *Cabernet sauvignon* (18,8°Brix), *Syrah* (18,6°Brix), *Egiodolla* (19,6°Brix), *Tempranillo* (21,2°Brix) e *Mouvedre* (17,6°Brix) e as variedades brancas foram *Chenin blanc* (20°Brix), *Petit verdot* (21°Brix) e *Itália* (17°Brix).

Aproximadamente 2 kg de cada cultivar de uva foram coletados diretamente do vinhedo e armazenados em embalagens assépticas e

transportadas em caixas térmicas à baixa temperatura. Entre o período da coleta das amostras e o procedimento de isolamento das leveduras não ultrapassou mais do que 24 horas.

2.2 MÉTODO

2.2.2 Isolamento de leveduras

De cada variedade de uva foram retiradas 25g e adicionadas em 225mL de água destilada estéril. Posteriormente as amostras foram homogeneizadas em *stomacher* Mc 1204 (Digital blender ITR) a 200 rpm por 2 minutos. Foi retirada uma alíquota de 0,1 ml da diluição decimal 10^{-1} e semeada com auxílio da alça de *Drigalski* em placas de Petri em duplicata para cada variedade, contendo o meio de Agar Yeast Malt (YM) (1% de glicose (Vetec); 2% de Agar bacteriológico (Acumedia); 0,5% de peptona (Acumedia); 0,3% de extrato de malte (Acumedia) e 0,3% de extrato de levedura (Acumedia), suplementadas com cloranfenicol (Himedia), na concentração de 0,001% (100mg/L). As placas foram incubadas invertidas em estufa BOD (Alfakit) a temperatura de 28° C por 48 horas (YARROW, 1998). Uma a oito colônias de leveduras representativas de cada amostra foram selecionadas ao acaso e purificadas em placas de Petri contendo o meio de cultura agar YM.

2.2.3 Manutenção das colônias selecionadas

As colônias puras foram novamente repicadas para tubos contendo o meio YM inclinado com adição de glicerina estéril (Vetec) e mantidas sob-refrigeração (4°C) para posterior identificação (Adaptado de KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

2.2.4 Identificação das leveduras

Um total de 60 isolados de leveduras foi submetido à identificação de acordo com Kurtzman, Fell e Boekhout (2011). Para discriminação rápida entre isolados *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* foi verificada a habilidade do crescimento em meio de cultura seletivo Agar L-Lisina (1,17% de *Yeast carbon base*-YCB (Difco), 2% de Agar (Acumedia) com adição de 0,056% de lisina (Merk) e 0,001% de cloranfenicol (Himedia). Para a identificação fisiológica, as leveduras

foram ativados em meio de cultura ágar YM por 24 horas a 25°C, em seguida foi realizada suspensão celular em tubo contendo 5 mL água destilada estéril. O nível de concentração celular foi estimado baseando-se no cartão de Wickerham, no nível 3+ de densidade celular forte (PRADO; CASTRO, 1995).

Os testes fisiológicos foram realizados com base na metodologia descrita por Yarrow (1998), seguindo as chaves taxonômicas de Kurtzman, Fell e Boeckhout (2011), utilizando como critério a assimilação de fontes de carbono e nitrogênio em condições de aerobiose; resistência/sensibilidade ao antifúngico cicloheximida a 0,01%; osmotolerância utilizando 50% de glicose e 10% de NaCl; termotolerância em temperatura de 37 e 40°C e habilidade em fermentar a glicose. As suspensões de leveduras foram inoculadas em placas de Petri contendo os meios de ágar YNB e ágar YCB (sem fonte de carbono e nitrogênio respectivamente) como controle negativo. As avaliações referentes à assimilação de compostos como fontes de carbono e nitrogênio foram realizadas por um período máximo de 21 dias (PRADO; CASTRO, 1995).

A partir das leveduras isoladas e agrupadas por meio dos testes fisiológicos foi realizada a análise morfológica por meio da coloração de Gram e tipo de reprodução pela técnica de preparação a fresco, entre lâmina e lamínula e ambos foram observados em microscópio óptico (1.000x) (YARROW, 1998).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as sessenta leveduras isoladas apresentaram habilidade de desenvolvimento em meio Agar L-lisina, sendo assim classificadas como não-*Saccharomyces*. Segundo Fleet, (2003) o meio de cultura L-lisina empregado para o desenvolvimento de leveduras de origem enológica, pode discrimina-las de forma rápida entre não-*Saccharomyces* e *Saccharomyces*, pois este meio não permite o crescimento de *Saccharomyces* devido à inabilidade desta em utilizar este aminoácido como fonte exclusiva de nitrogênio.

Os isolados foram submetidos à identificação fisiológica, de forma a agrupá-las com base nas respostas dos testes bioquímicos (YARROW, 1988; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011) (Tabela 1). Das 60 leveduras classificadas como não-*Saccharomyces*, 40 foram agrupadas como pertencente ao gênero *Hanseniaspora* spp. (leveduras de números 1 a 40).

Deste grupo de 40 leveduras, 17 (leveduras de números 24 a 40 - Tabela 1), responderam de forma similar para a assimilação de compostos de carbono (glicose, celobiose, D-gluconato) e nitrogênio (todas se desenvolveram em meio com lisina e em meio ausente de aminoácidos), quanto à termotolerância se desenvolveram a temperatura de 37°C, cresceram em meio contendo cicloheximida a 0,01%, mostrando resistência ao antifúngico nesta concentração. De acordo com a chave taxonômica utilizada as leveduras foram classificadas como espécie sugestiva de *Hanseniaspora guilliermondii* (Anamorfo *Kloeckera apis*). Kurtzman, Fell e Boekhout (2011) constataram que a *Hanseniaspora guilliermondii* se desenvolve a temperatura de 37°C, diferenciando-se das demais leveduras do gênero *Hanseniaspora* spp.

Estudos similares para identificação de leveduras por meio de testes bioquímico/fisiológicos foram realizados por vários pesquisadores. Moreira et al.(2005) ao avaliarem as características fisiológicas da *H. guilliermondii* e *H. uvarum* por meio de testes bioquímicos, revelaram que a *H. guilliermondii* se desenvolveu a temperatura de 37°C e meio de cultivo contendo 0,01% de cicloheximida. Barata et al. (2008), isolaram leveduras

Tabela . Características fisiológicas das leveduras isoladas do “Vale do Submedio São Francisco”.

Testes fisiológicos	Total de <i>Hanseniopora</i> agrupada																																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melzitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido solúvel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-Lactato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Succinato	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexadecano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etilacetato	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isopropanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconato	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-Acetilglucosamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Meio sem aminoácido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10% de NaCl	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Carbonato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido acético	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50% de glicose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,01% de cicloheximida	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento 40°C	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Fermentação glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: (+) Assimilou compostos de carbono e nitrogênio;
Cresceu a 37 e/ou 40°C;
Fermentou glicose

Legenda: (-) Não assimilou compostos de carbono e nitrogênio;
Não cresceu a 37 e/ou 40°C;
Não fermentou glicose

de uvas da cultivar Trincadeira preta e por meio de testes fisiológicos e de termotolerância, diferenciaram as leveduras *Hanseniaspora guilliermodii* pelo seu crescimento em temperatura de 37°C da *H. uvarum*.

Combina et al. (2005) isolaram e identificaram *Kloeckera apiculata* (telemorfo, *Hanseniaspora uvarum*) entre outras leveduras não-*Saccharomyces* da superfície de uvas *Malbec*, cultivadas na região de Mendoza (Argentina). Mamede e Pastore (2004) identificaram *K. apiculata* e *S.cerevisae* em uvas da cultivar *Chardonnay* provenientes da região da Serra Gaúcha (RS) por meio de testes fisiológicos utilizando o Kit API ID 32C (BioMérieux).

Li et al. (2010) isolaram e identificaram leveduras em uvas da variedade *Cabernet sauvignon* na região da China . Esses autores utilizaram o meio de cultura ágar L-lisina para agrupar as leveduras em *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*. Este teste fisiológico permitiu determinar que a maioria dos isolados foram identificados como pertencentes ao grupo das não-*Saccharomyces*. Os autores consideraram este resultado importante e sugeriram maiores estudos de investigação do papel destas leveduras na qualidade do vinho.

Quanto á avaliação morfológica, as 40 leveduras agrupadas neste estudo como *Hanseniasporas* apresentaram morfologia apiculada, reprodução assexuada por brotamento bipolar. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Fleet em 2003, que verificou que as leveduras apiculadas são predominantes nas superfícies de uvas maduras em especial as do gênero *Hanseniaspora* (anamorfa de *Kloeckera*) e *Metschnikowia*.

Segundo Bisson e Kukee (1991) a forma anamorfa da levedura (*Kloeckera*) é predominante em regiões de clima frio. Em 1998, Yarrow observou que a predominância dos gêneros de leveduras *Kloeckera* spp e *Hanseniaspora* spp está diretamente relacionada com a região e a altitude onde se localizam os vinhedos e concluiu que em regiões de altas altitudes há um maior predomínio das leveduras *Kloeckera* spp e em baixas altitudes de *Hanseniaspora* spp. Os vinhedos em estudo estão situados nos municípios localizados no Vale do Submédio São Francisco, apresentando média altitude, 361 a 380 m acima do nível do mar (CHAVES, et al., 2004), portanto a predominância de leveduras do gênero *Hanseniaspora* nas uvas estudadas pode ser explicada pelas condições edofo-climáticas da região do “Vale do Submédio São Francisco”.

4 CONCLUSÃO

A predominância de leveduras *Hanseniaspora* spp em uvas frescas cultivadas no “Vale do Submédio São Francisco” pode ter importante significado para a indústria vinícola local, na possibilidade de utilização durante a fermentação espontânea do vinho. Entretanto, estudos complementares de identificação molecular devem ser realizados para explorar a utilização de leveduras deste gênero nos processo biotecnológico e produção de vinho.

REFERÊNCIAS

BARATA A.; MALFEITO-FERREIRA M.; LOUREIRO, V. The microbial ecology of wine grape berries. **International Journal of Food Microbiology**, v.153, n.3, p.243–259, 2012.

BARATA, A.; GONZALEZ, S.; MALFEITO-FERREIRA, M.; QUEROL, A.; LOUREIRO, V. Sour rot-damaged grapes are sources of wine spoilage yeasts. **FEMS Yeast Res**, v.8, n.7 p. 1008–1017, 2008.

BISSON, L.F.; WATERHOUSE, A.L.; EBELER, S.E.; M. WALKER, A.; LAPSLEY, J.T. The present and future of the international wine industry. **Nature Publishing Group**, v.418, n.6898, p.696-699, 2002.

BISSON, L.F.; KUNKEE, R.E. Microbial interactions during wine production. In: ZEIKUS, J.G.; JOHNSON, E.A. **Mixed cultures in biotechnology**, McGraw-Hill, Inc., p. 39-68, 1991.

CHAVES L.H.G. TITO, G.A.; CHAVES, I.B.; LUNA, J.G.; SILVA, P. C. M.; Propriedades químicas do Solo Aluvial da Ilha de Assunção-Cabrobó (Pernambuco). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.28, n.3, 2004.

COMBINA, M., MERCADO, P., BORGIO, A. E., JOFRÉ, V., GANGA, A., MARTINEZ, C., CATARINA, C. Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n.5, p.1055–1061, 2005.

FLEET, G.H.; HEARD, G.M. Yeast-growth during fermentation. In: FLEET, G. H. **Wine Microbiology and Biotechnology**, Academic Publishers, 1993.chapter. 2. p. 27–54.

FLEET, G.H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, n (1-2), p. 11 – 22, 2003

FLEET, G.H. Wine yeasts for the future. **FEMS Yeast**, v.8, n.7, p.979–995.2008.
GANGA, M.A.; MARTINEZ C. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-Saccharomyces yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, n. 1, p. 76-83, 2004.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA: Relatório de estação Geodésica. Brasil. p.1, 2006.

_____: Relatório de estação Geodésica. Basil. 1p, 2011.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, J. **The Yeasts, A Taxonomic Study**, Fifthy edition. Elsevier, 1873p, 2011.

LI, S.S.; CHENG, C.; LI, Z.; CHEN, J.Y.; YAN, B.; HAN, B.Z.; REEVES, M. Yeast species associated with wine grapes in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, n (1-2), p. 85–90, 2010.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE G. M. Avaliação da produção dos Compostos majoritários da Fermentação de Mosto de Uva por Leveduras Isoladas da Região da “Serra Gaúcha” (RS). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 453-458, 2004.

MOREIRA, N.; MENDES, F. HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. **International Journal Food Microbiology**, v.103, n.3, p.285-294, 2005.

PRADO, G.M. M; CASTRO, M.M.S. **Usinas de açúcar e álcool: estudos de leveduras e dos fatores que afetam a fermentação**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, 1995. 49p.

PRETORIUS, I.S; WESTHUIZEN vaan der J.J; AUGUSTYN, O.P.H. Yeasts Biodiversity in Vineyards and Wineries and Its importance to the South African wine industry. **South African Journal Enology Viticulture**, v.20, n.2, p. 61-74, 1999.

SILVA, P.C; CORREIA, R.C; SOARES, J. M. Histórico e Importância Sócio econômica. In: SOARES, J.M; SOUZA, P. C. **A vitivinicultura no Semiárido Brasileiro**. Embrapa Semiárido. 2009.cap 1.p.19-34.

VIEIRA, A.T.; MELO F.; LOPES, H.B.V.; CAMPOS, J.C.V.; BONFIM, L.F.C.; COUTO, P.A.A.; PINOTTI, S.M. **Projeto Cadastro de fonte de Abastecimento por água subterrânea. Diagnóstico do município de Casa Nova - Bahia. Brasil**. Ministério de Minas e Energia, p.1-28,2005.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The Yeasts, A Taxonomic Study**. Fourth edition. Elsevier Science BV, 1998.chapter 11.p.75-107.

CAPÍTULO III

ESTUDO DO COMPORTAMENTO FERMENTATIVO DE LEVEDURAS DE UVAS *Vitis Viniferas* L. DA REGIÃO DO VALE DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO

RESUMO

A diversidade de leveduras indígenas não-*Saccharomyces* isoladas de uvas *Vitis viniferas* L. contribue para as características sensoriais, tipicidade e qualidade do vinho. Esta pesquisa teve como objetivo estudar o comportamento fermentativo e perfil sensorial de leveduras não-*Saccharomyces* isoladas de uvas *Vitis viniferas* L. e inoculadas em mosto de uva *Cabernet sauvignon*, *Chenin blanc* e *Rosé*. A estirpe *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus* foi obtida comercialmente e utilizada como controle. As leveduras utilizadas nos ensaios fermentativos foram previamente identificadas por meio do seqüenciamento da região D1/D2 da subunidade 26S do RNA ribossomal em *H.opuntiae* e *Cryptococcus flavescens*. As fermentações foram realizadas em triplicata durante sete dias. A cada 24 horas foi determinada a biomassa das leveduras e pH para estudar o comportamento fermentativo em temperaturas de 15 e 25°C. A *H.opuntiae* foi a levedura não-*Saccharomyces* que no final das 168 horas da fermentação (fase de declínio celular) não apresentou redução da biomassa celular. O pH manteve-se na faixa ideal para produção de vinho. Para realização dos testes afetivos sensoriais foi empregado as leveduras não-*Saccharomyces*, *H.opuntiae* e *C. Flavescens* e a *S.cerevisiae* variedade *bayanus*. A aceitabilidade das amostras e intenção de compra do mosto fermentado em relação aos aromas de vinhos Branco, *Rosé* e Tinto foi avaliada usando testes afetivos sensoriais, nos períodos de 72, 96 e 120 horas de fermentação. A Análise Univariada de Variância (ANOVA) realizada entre as amostras, indicou que o aroma produzido pelo mosto fermentado *Chenin blanc* pela levedura *H.opuntiae*, apresentou a maior média de aceitação (7,3) no período de 120 horas, com intenção de compra de 76%, maiores médias de aceitação e intenção de compra também foram observadas para as amostras dos mostos *Chenin blanc*, *Rosé* e *Cabernet sauvignon* fermentados pela combinação das leveduras *H.opuntiae* e *S. cerevisiae*. As leveduras não-*Saccharomyces* em especial as apiculadas, podem favorecer a formação de aroma agradável e contribuir de maneira significativa para a qualidade dos vinhos.

Palavras-chaves: Testes afetivos sensoriais, biomassa, não-*Saccharomyces*, fermentação.

ABSTRACT

The diversity of indigenous yeasts isolated *non-Saccharomyces* of *Vitis Viníferas* L. grapes helps to the sensory characteristics, typical characteristics and quality of the wine. This research aimed to study the fermentative behavior and sensory profile of isolated *non-Saccharomyces* yeasts of *Vitis viníferas* L. grapes and inoculated in grape must and Cabernet sauvignon, Chenin blanc and Rosé. The *Saccharomyces cerevisiae* species strain, *bayanus* variety, was obtained commercially and used as control. The yeasts used in fermentation trials were identified in advance through the D1/D2 region's sequencing of 26S subunit of ribosomal RNA in *H. opuntiae* and *Cryptococcus flavescens*. The fermentations were conducted in triplicate during seven days. Every 24 hours the biomass of yeasts and pH was given for studying the fermentative behavior in temperatures of 15 and 25° C. *H. opuntiae* was the *non-Saccharomyces* yeast that at the end of the 168 hours of fermentation (cell decline stage) did not present reduction of the cellular biomass. The pH remained on ideal track for wine production. For accomplishing sensory affective tests was employed the *non-Saccharomyces* yeasts, *H. opuntiae* and *C. Flavescens* and *S. cerevisiae* species, *bayanus* variety. The acceptability of samples and purchase intention of fermented must for White, Rosé and Red wines aromas was evaluated using sensory affective tests in periods of 72; 96 and 120 hours of fermentation. The variance univariate analysis (ANOVA) held between samples, indicated that the aroma produced by fermented must Chenin blanc by yeast *H. opuntiae*, presented the highest average of acceptance (7.3) within 120 hours, with purchase intent of 76, bigger average of acceptance and purchase intent have also been observed for samples of musts Chenin blanc, Rosé and Cabernet sauvignon fermented by the combination of *H. opuntiae* and *S. Cerevisiae* species yeasts. The *non-Saccharomyces* yeasts particularly apiculates, can promote the formation of pleasant aroma and contribute in significant way to the quality of the wines.

Keywords: sensory affective tests, biomass, non-Saccharomyces, fermentation.

1 INTRODUÇÃO

A composição do mosto de uva, a exemplo do teor de dióxido de enxofre, nitrogênio e teor de sólidos totais (°Brix), assim como a acidez, temperatura, tipos de leveduras e pH durante o processo fermentativo afetam a cinética da fermentação alcoólica (JACKSON, 2008). Charoenchai, Fleet e Henschke (1998) verificaram que o pH não influencia na velocidade de crescimento das leveduras ou na síntese de biomassa celular durante a fermentação. Estudo realizado por Molina et al.(2007) para verificar a influência da temperatura na formação da biomassa de leveduras, observaram que este parâmetro foi o principal fator que influenciou na fermentação e contribui para qualidade do aroma final do vinho, sendo que a evolução da biomassa formada foi similar nas temperaturas testadas (15 e 28°C).

A complexidade do aroma e sabor dos vinhos produzidos pela fermentação do mosto de uva varia de acordo com os aromas primários presentes nas uvas, secundários, decorrentes do processo fermentativo e terciários produzidos após a fermentação, durante o envelhecimento (MARKS; VAN DER MERWE; VAN VUUREN, 2003). Para determinar a preferência e a aceitação de determinado produto, deve-se avaliar as suas propriedades sensoriais, a exemplo do aroma, sabor e aparência (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2007). Os testes sensoriais utilizados para mensurar as características sensoriais do vinho, podem detectar as diferenças entre os tipos de vinho, quantificar atributos sensoriais e verificar a aceitação entre os consumidores (KING et al., 2010). O aroma e o sabor do vinho são as principais características que definem a qualidade e diferença entre o estilo do vinho em todo o mundo (SAN-JUAN et al., 2011).

As leveduras não-*Sacharomyces* presentes no mosto de uva podem persistir durante o processo de fermentação alcoólica e contribuir para o aroma e *buquet* do vinho (ROMANO et al., 2003). Em pesquisa realizada por Jolly, Augustyn e Pretorius (2003) permitiram verificar que o vinho produzido por fermentação combinada de leveduras não- *Saccharomyces* e *Saccharomyces* tiveram uma melhor qualidade do que os produzido apenas com a *Saccharomyces cerevisiae*. Mamede, Cardello e Pastore (2005) em pesquisa realizada, determinaram que o aroma de vinho espumante produzido pela levedura não-*Saccharomyces Pichia membranaefaciens* teve uma melhor

aceitação e intenção de compra entre os julgadores do que o aroma produzido com a *S.cerevisae*.

A preferência dos consumidores por bebidas de qualidade e produtos típicos da região é o que regulamenta o sucesso de alguns vinhos regionais. A estratégia de marketing esta voltada para a produção de vinhos com características peculiares regionais, para torna-se competitivo (GIL; SÁNCHEZ, 1997). Pesquisa realizada por Révillion et al. (2007) avaliaram que os vinhos finos tintos elaborados no Rio Grande do Sul é competitivo com os vinhos produzidos no Chile e na Argentina. A pesquisa foi realizada entre 31 consumidores potenciais de vinhos finos da cidade de Porto Alegre, Brasil. Bernabéu et al.(2008), propuseram que é de grande importância valorizar a origem do vinho ou inovar o produto com características particulares da região onde o vinho é produzido.

É de grande importância conhecer o perfil fermentativo de leveduras indígenas não-*Saccharomyces* na região do Vale do Submédio São Francisco para serem utilizadas no processo de produção de vinhos. Diante do exposto o objetivo deste estudo foi estudar o comportamento fermentativo e perfil sensorial de leveduras não-*Saccharomyces* isoladas de uvas *Vitis viniferas* L.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Análise Sensorial do Departamento de Análise Bromatológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia-UFBA.

2.1 MATERIAL

2.1.1 Leveduras utilizadas na fermentação

As leveduras utilizadas na fermentação foram isoladas de uvas *Vitis viniferas* L. da região do Vale do Submédio São Francisco.

2.1.2 Amostras de mosto

Os mostos de uva utilizados foram das cultivares *Vitis viniferas* L. *Chenin blanc* e *Cabernet sauvignon* e *Rosé* (combinação de uvas *Vitis viniferas* L.

tinta e branca) coletados em janeiro e novembro de 2011, oriundos das vinícolas dos municípios de Casa Nova (Bahia), 380 metros de altitude, latitude Sul 09°05'00'', longitude 40°37'00''(VIEIRA et al., 2005) e Lagoa Grande (Pernambuco), 361 metros de altitude (IBGE,2011) , 8°59'47'' de latitude Sul, longitude 40°16'18''(IBGE, 2006) situadas na região do Vale do Submédio São Francisco. O mosto fresco foi coletado diretamente dos tanques de fermentação da planta de processamento das vinícolas com adição de dióxido de enxofre e acondicionados em garrafas plásticas, previamente desinfetadas, com capacidade para 5 litros e congelados até o momento do processo.

2.2 MÉTODO

2.2.1 Identificação das Leveduras utilizadas na fermentação

As leveduras não-*Saccharomyces* foram identificadas por meio do seqüenciamento da região D1/D2 da subunidade 26S do RNA ribossomal (KURTZMAN; ROBNETT, 1998).

2.2.2 Preparo e Análise do mosto

Os mostos foram descongelados sob-refrigeração, ao abrigo da luz e inicialmente filtrado á vácuo utilizando papel filtro Quanty de porosidade de 28 µm, posteriormente foram realizadas filtrações sucessivas utilizando membrana de nitrato celulose de porosidade 0,45 µm e 0,22µm (Sartorius) respectivamente. Antes da realização da fermentação, foi verificado o grau °Brix do mosto por meio do refratômetro manual (Atago/ 2313). O pH foi verificado por meio do pHmetro (Phtek/ P100) e a acidez total (expressa em meq/L) foi determinada por meio da titulação de neutralização dos ácidos para bebidas fermento-destiladas (IAL, 2004). O teor de dióxido de enxofre e de nitrogênio presentes no mosto foi determinado nas vinícolas e as informações foram concedidas para a realização do trabalho.

2.2.3 Condições de Fermentação

Para realização das fermentações, os mostos *Chenin Blanc*, *Cabernet sauvignon* e *Rosé* foram inoculados com leveduras previamente identificadas em

Hanseniaspora opuntiae e *Cryptococcus flavescens*. A levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus* (Maurivin-PDM) foi empregada como controle do processo fermentativo. As fermentações foram conduzidas em triplicata sob temperaturas de 15°C para o mosto *Chenin blanc* e 25°C para os mostos *Rosé* e *Cabernet sauvignon*.

Os isolados das leveduras foram previamente ativados em meio de Agar Yeast Malt (YM) (1% de glicose (Vetec), 2% de Agar bacteriológico (Acumedia), 0,5% de peptona (Acumedia), 0,3% de extrato de malte (Acumedia) e 0,3% de extrato de levedura (Acumedia)). As placas foram incubadas invertidas em estufa BOD (Alfakit) a temperatura de 28° C por 48 horas (YARROW, 1998). Após este período de incubação foi realizada padronização do inóculo com 10⁶ UFC/mL de leveduras de acordo com a escala Mc Farland e leitura em espectrofotômetro (Femto 800 XI), com faixa de densidade óptica de 0,08-0,1 e absorvância de 625 nm. A alíquota de 1 mL da suspensão de leveduras foi correspondente a 10⁶ UFC/mL (equivalente a 0,5g/L da biomassa da levedura previamente obtida antes do processo fermentativo).

O valor correspondente a 10⁶ UFC/mL da suspensão de leveduras foi adicionado em 83,3mL de mostos *Chenin blanc*, *Rosé* e *Cabernet sauvignon* (este valor corresponde a 1/3 do volume do erlemeyer de 250 mL) para iniciar o processo fermentativo. As amostras foram incubadas em *Shaker* de agitação orbital, modelo Thecnal (TE-424) a 100 rpm por 168 horas (7 dias). A cada 24 horas da fermentação os parâmetros cinéticos da fermentação, biomassa celular (expressa em g/L) e pH foram avaliados (Adaptado de MAMEDE; PASTORE, 2004).

2.2.4 Avaliação do aroma dos mostos fermentados

O aroma dos mostos fermentados foi avaliado pelo teste de aceitação de consumidor. A aceitabilidade das amostras do mosto fermentado comparado ao aroma de vinho Branco, *Rosé* e Tinto foi avaliada por 50 julgadores previamente recrutados baseando-se na frequência de consumo de vinho e habilidade de realização de testes sensoriais. As amostras fermentadas em cada período avaliado foram apresentadas ao julgador de forma balanceada e codificadas. Em cada sessão foi apresentada 4 amostras totalizando 9 sessões

de análises. Cada sessão de análise foi realizada pelos mesmos julgadores. Foram utilizadas taças de vidro para cada amostra.

Para o teste de aceitação foi utilizada a escala hedônica de 9 pontos com definição, com extremos de “desgostei muitíssimo” a “gostei muitíssimo”, correspondendo ao 1 ao 9 respectivamente (Apêndice D). Na mesma ficha foi avaliada a intenção de compra das amostras, a qual foi registrada em escala de 5 pontos com definição, com extremos de “certamente compraria” (1) a “certamente não compraria”(5), como observado no Anexo 1 (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2007). Os resultados foram tratados estatisticamente utilizando Análise Univariada de Variância (ANOVA) e teste de média de *Tukey* ($p < 0,05$), utilizando o software SASS versão 6.11. A pertinência ética da proposta deste estudo foi avaliada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Bahia-UFBA, recebendo parecer favorável de número 094/ 2009 e registro no CEP 102/2009.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo duas leveduras isoladas de uvas frescas *Vitis vinifera* L. da região do Vale do Submédio são Francisco foram identificadas em *H.opuntiae* e *C. flavescens*. Nychas e Nisiotou (2007) isolaram leveduras do gênero *Hanseniaspora* em amostras de uvas *Vitis viniferas* tintas das cultivares *Mavroliantis* e *Sefka* colhidas de vinhedo experimental na Universidade de Atenas na Grécia e identificaram por meio do seqüenciamento da região D1/D2 da subunidade 26S do RNA ribossomal e análise da região rRNA ITS 5.8S (PCR-RFLP), e verificaram que 67% das *Hansenisporas* eram pertencentes à espécie *H. opuntiae*. Sun et al.(2009), isolaram leveduras a partir de uvas *Vitis viniferas* L. *Merlot* e *Roussane* de regiões viníferas da China e identificaram por seqüenciamento da região D1/D2 da subunidade 26S do RNA ribossomal o *C. flavescens* da cultivar *Merlot*.

As leveduras isoladas e identificadas por meio de biologia molecular foram utilizadas para o estudo do comportamento fermentativo e avaliação sensorial dos mostos fermentados em diferentes períodos. Os mostos empregados foram das cultivares *Carbenet sauvignon*, *Chenin Blanc* e *Rosé*. Os parâmetros químicos dos mostos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Características químicas dos mostos de uvas *Cabernet sauvignon*, *Chenin blanc* e *Rosé* coletados em duas vinícolas da Região do Submédio São Francisco.

Parâmetros	Mostos		
	<i>Cabernet sauvignon</i>	<i>Chenin blanc</i>	<i>Rosé</i>
pH*	3,6	3,4	3,2
°Brix*	18	19	15
SO ₂ **	35mg/L	50mg/L	50mg/l
Acidez total*	82.1 meq/L	84meq/L	128,1meq/L
Nitrogênio	98mg/L	116mg/L	92mg/L

*Dados obtidos no Laboratório de Pesquisa de análise de Alimentos e contaminantes

**Dados fornecidos pelas vinícolas estudadas

Segundo Heard e Fleet (1988) e Jackson (2008), a faixa de pH entre 2,8 a 4,4 é considerada adequado para produção de vinho por restringir e selecionar os microrganismos presentes nos mostos e estabilizar o produto final. Os valores de pH mensurados para os mostos de uvas estudados estão dentro da faixa estabelecidas para serem usados na fermentação (Tabela 1). A acidez total dos mostos estudados juntamente com os valores de pH apresentaram valores dentro do limite estabelecido para a produção de vinho, de acordo com Ribéreau-Gayon et al., (2006).

O °Brix (sólidos totais) é um indicador bastante preciso do teor de açúcar no mosto e representa a capacidade deste para sustentar a produção de álcool pelas leveduras (JACKSON, 2008). O °Brix das uvas destinadas à elaboração de vinhos tintos, brancos e espumantes devem apresentar valores entre 18 e 22°, 18 e 20° e 17 a 18° respectivamente, podendo variar a depender do estilo do vinho (MANDELLI; ZANUS, 2009). Neste estudo o teor de sólidos totais variaram de 15 a 19° Brix.

O SO₂, favorece a inibição de microrganismos deteriorantes e oxidação dos compostos fenólicos, além da redução do pH (RIBÉREUA-GAYON, 2006). O SO₂ foi adicionado nos mostos antes do processo fermentativo nas próprias vinícolas e variou de 35 a 50mg/L, sendo eficiente no controle da microbiota natural dos mostos de uva e na manutenção do pH na etapa do transporte até o

laboratório. A faixa de SO_2 adequada é de 50-100mg/L dependendo da sanidade da fruta e da temperatura de maceração (JACKSON, 2008).

Em geral, os mostos de uvas são considerados deficientes em nitrogênio sendo que o valor mínimo requerido para elaboração do vinho é de 140 a 150 mg N/L (EDWARDS; FUGELANG, 2007). Neste estudo o valor de nitrogênio presente nos mostos variou de 92 a 116mg/L, constatando a deficiência de nitrogênio nos mostos empregados nos ensaios de fermentação. O nitrogênio é considerado principal nutriente limitante do crescimento das leveduras e do desempenho da fermentação (BISSON, 1999).

As Figuras 1A e 1B representam os resultados da biomassa e pH do mosto *Chenin Blanc* a 15°C em função do tempo de fermentação.

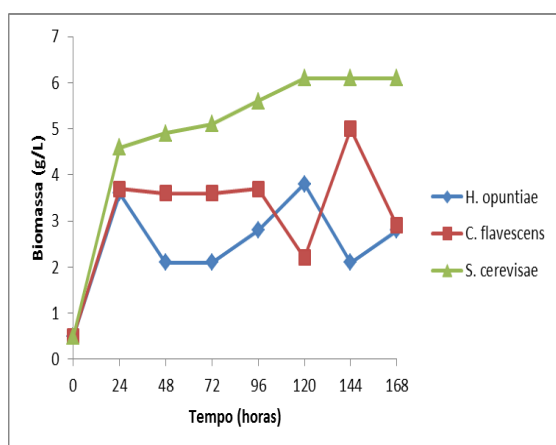


Figura 1A- Evolução da população de cultura pura de leveduras em mosto de uva *Chenin Blanc*. Os valores da biomassa (g/L) foram as médias obtidas das aferições a cada 24 horas.

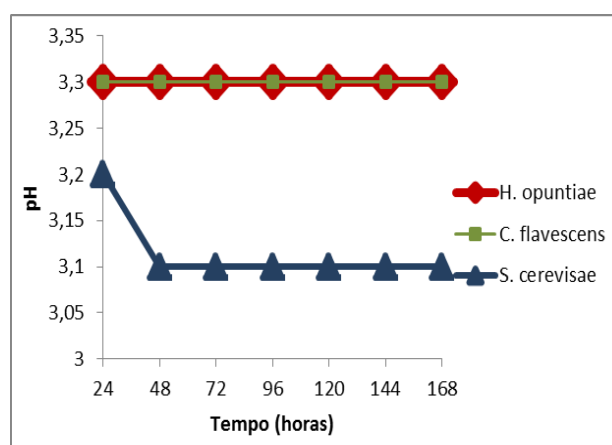


Figura 1B- Evolução do pH em mosto de uva *Chenin Blanc*. Os valores do pH foram as médias obtidas das aferições a cada 24 horas.

As análises das curvas de crescimento das biomassas representadas no gráfico 1A permitiram identificar que a fase exponencial (fase *log*) das estirpes estudadas ocorreu nas primeiras 24 horas de fermentação, sendo o máximo de biomassa alcançada em 120 horas para *Hanseniaspora opuntiae* (3,8 g/L), 144 horas para a estirpe *Cryptococcus flavecens* (5,0 g/L) e 120 horas para a *S.cerevisae* (6,1 g/L), tempo similar a *H. opuntiae*. Dentre as estirpes estudadas quem melhor converteu o substrato em biomassa foi a *S. cerevisae* (Figura 1A).

Observou-se redução populacional somente para o *C. flavecens* (Figura 1A) no final da fermentação (fase de declínio). Jackson (2000) relata que

em temperaturas inferiores a 20°C a biomassa de leveduras declina rapidamente no final da fermentação. Alguns fatores podem está associado ao declínio de biomassa celular, dentre eles, o próprio mosto de uva, o qual representa um ambiente de estresse devido a alta concentração de açúcar (elevada pressão osmótica) e presença de SO₂ (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006), exercendo assim pressão seletiva sobre os microrganismos. Entretanto a *H. opuntiae* (Figura 1A) apresentou melhor adaptação ao meio, provavelmente devido à resistência ao álcool, resultante do consumo inicial de açúcar, com aumento da biomassa após 144 horas, portanto, não foi observada fase de declínio celular. Heard e Fleet (1988) relataram que baixa temperatura de fermentação (entre 10 e 20°C) favorece o crescimento e persistência de leveduras *Kloeckera* spp (telemorfa *Hanseniaspora* spp.) ao longo do processo fermentativo, sugerindo assim a tolerância destas leveduras ao etanol.

A fase estacionária na curva de crescimento conduzida pela *S.cerevisae* ocorreu após 120 horas e também não foi observado declínio da biomassa celular. O pH dos mostos estudados variaram entre 3,3 a 3,1 (Figura 1B), este leve declínio não afetou portanto o crescimento celular das leveduras inoculadas no mosto e nem o máximo de biomassa produzida (Figura 1A).Em ensaio fermentativo realizado por Charoenchai, Fleet e Henschke (1998), os autores observaram que o máximo de biomassa na fermentação inoculada com *S. cerevisae* a temperatura de 15°C foi de 2,2g/L, sendo que a variação de pH de 3,0 a 4,0 não afetou o máximo de biomassa alcançado.

Neste estudo, o processo fermentativo iniciou de forma rápida e vigorosa nas primeiras 24 horas. Entretanto Mamede e Pastore (2004) ao avaliarem o crescimento das leveduras isoladas da Serra Gaúcha (RS) por meio da determinação da biomassa celular da *Kloeckera apiculata* e *Saccharomyces cerevisae* em fermentação de mosto *Pinot noir* e *Chardonnay* em temperatura de 15°C, constataram que o crescimento celular foi lento e que a fase exponencial variou entre 72 e 96 horas para as duas leveduras estudadas, sendo que a biomassa celular máxima da *Kloeckera apiculata* foi semelhante para os dois mostos estudados (0,007g/L).

As Figuras 2A; 2B; 3A e 3B representam os resultados da biomassa e pH dos mostos *Rosé* e *Cabernet sauvignon* a 25°C em função do tempo de fermentação

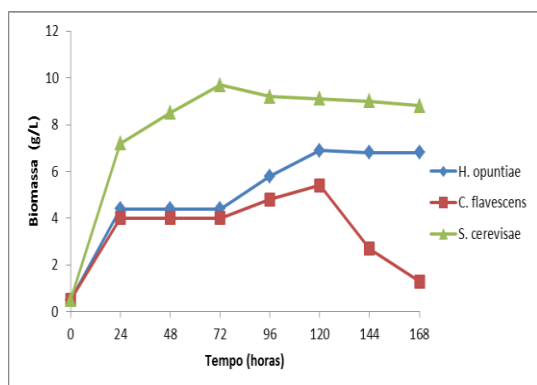


Figura 2A- Evolução da população de cultura pura de leveduras em mosto de uva *Rosé*. Os valores da biomassa (g/L), foram as médias obtidas das aferições a cada 24 horas.

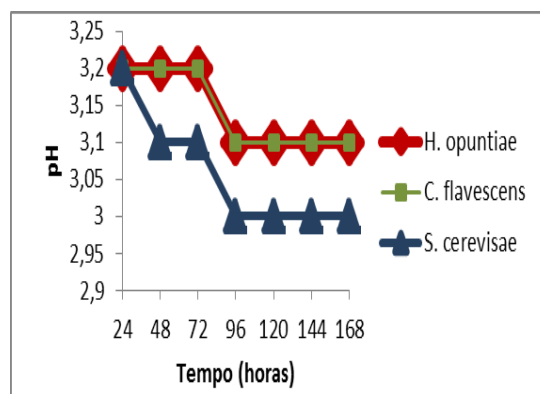
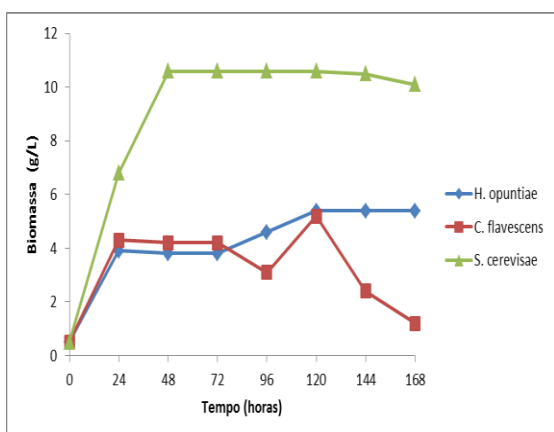


Figura 2B- Evolução do pH em mosto de uva *Rosé*. Os valores do pH foram as médias obtidas das aferições a cada 24 horas.



Figuras 3A - Evolução da população de cultura pura de leveduras em mosto de uva *Cabernet sauvignon*. Os valores da biomassa (g/L) foram as médias obtidas das aferições a cada 24 horas.

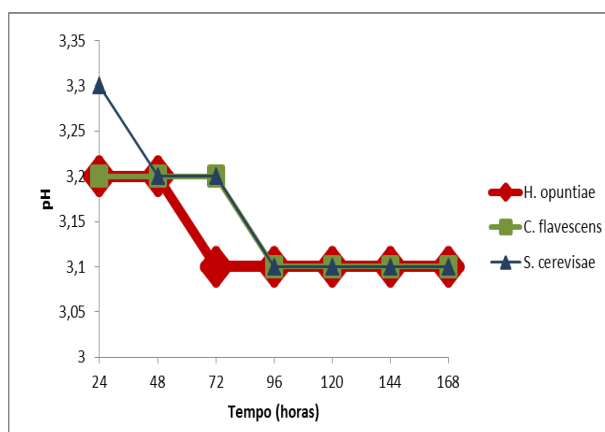


Figura 3B - Evolução do pH em mosto de uva *Cabernet sauvignon*. Os valores do pH foram as médias obtidas das aferições a cada 24 horas.

Os resultados dos ensaios fermentativos indicaram que a estirpe *H. opuntiae* apresentou maior concentração de biomassa no tempo de 120 horas (6,9g/L e 5,4 g/L) (Figuras 2A e 3A) em pH 3,1 nos mostos *Rosé* e *Cabernet sauvignon* respectivamente. Após este período esta levedura entrou na fase estacionária, não sendo observado declínio celular. O *C. flavescens* apresentou máximo de biomassa celular em tempo de 120 horas (5,4 g/L e 5,2 g/L) em pH 3,1 nos mostos *Rosé* e *Cabernet sauvignon* respectivamente, não foi percebido fase estacionária e ocorreu declínio acentuado da biomassa celular após 120 horas

(Figuras 2A e 3A). Este declínio celular pode estar associado aos fatores de estresse a exemplo do acúmulo de etanol e deficiência de nitrogênio (CARDONA et al, 2007). A *S. cerevisiae* apresentou maior valor de peso seco em todo processo fermentativo, em relação às demais leveduras não-*Saccharomyces* e alcançou o máximo de biomassa com 72 e 48 horas (9,7g/l e 10,6 g/L) em pH 3,1 e 3,2 nas fermentações do mosto *Rosé* e *Cabernet sauvignon* respectivamente a 25°C. No ensaio realizado por Berovic et al. (2003) para avaliar o acúmulo de biomassa celular em função de diferentes temperaturas (18, 22 e 26°) empregando mosto *Cabernet sauvignon* e levedura *S. cerevisiae* variedade *bayanus*, os autores constataram que a temperatura influenciou na síntese da biomassa celular pelas leveduras. A maior produção de biomassa celular (3,5g/L) foi detectada em temperatura de 26 °C.

Neste estudo o maior valor da biomassa celular (expressa em g/L) foi observado quando as fermentações foram submetidas à temperatura de 25°C. A temperatura representa um dos mais significantes parâmetros que afeta o processo de fermentação e síntese de produtos metabólicos que reflete diretamente na qualidade final de vinho (FRANCESCA et al., 2010). Zhuge et al. (2005) constataram também que o aumento da temperatura foi o fator que influenciou diretamente na síntese de biomassa celular em ensaio fermentativo realizado. A levedura *S.cerevisiae* (industrial) usada na fermentação do mosto *Rosé* e *Cabernet sauvignon* (Figura 2A e 3 A) após 72 e 48 horas respectivamente entrou na fase estacionária, percebendo-se discreto declínio da biomassa celular, este fato pode está associado à deficiência de nitrogênio nos respectivos mostos estudados (92 e 116 mg/L). Manginot et al. (1998), relatam que as leveduras enológicas apresentam exigências de nitrogênio diferenciadas e deficiências são percebidas na fase estacionária para as leveduras industriais. As leveduras presentes no mosto de uva necessitam de quantidades significativas de nitrogênio assimilável para sintetizar sua biomassa celular (KUNKEE, 1991), sendo assim, o nitrogênio presente no mosto, por si só não é suficiente para assegurar que será utilizado para produção de biomassa celular (FERREIRA, 2004). No nosso estudo foi evidenciado declínio gradual da biomassa celular da *S.cerevisiae* e pH após 72 horas de fermentação no mosto *Rosé* (Figura 2 A). Fleet e Heard (1993) em experimento realizado observaram que a biomassa

celular da *S. cerevisiae* e o pH do mosto de uvas *Vitis vinifera* L. declinaram à medida que avançava o processo fermentativo.

Serra, Strehaiano e Taillandier (2005), utilizando meio de cultivo sintético realizaram fermentação inoculada em nível laboratorial para avaliar a influência do pH na biomassa celular de leveduras *S. bayanus* variedade *uvarum* e demonstraram que o pH variou de 3 a 5 e não exerceu influência significativa sobre a concentração de biomassa destas leveduras. Os autores concluíram que a temperatura foi o principal fator que influenciou diretamente na síntese de biomassa celular, e este efeito positivo está diretamente proporcional ao aumento da produtividade de biomassa, isto é, quando aumenta a temperatura aumenta também a biomassa.

Nesta pesquisa o pH dos mostos fermentados manteve-se dentro da faixa ideal durante os sete dias de fermentação, reduzindo de 0,1 até 0,3 unidades durante a fermentação, entretanto não foi observada influencia no aumento da biomassa celular. Bisson (1999), relata que o pH do mosto de uva pode ser reduzido em até 0,3 unidades durante a fermentação. O mosto de uva representa um ambiente de estresse devido ao pH baixo, entretanto a faixa de pH entre 2,5 a 4,25 não exerce efeito negativo no aumento de biomassa de leveduras, especialmente do gênero *Saccharomyces* (PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1989).

Diante dos resultados deste estudo para avaliar a cinética da fermentação inoculada por meio da determinação da biomassa e pH em mostos *Chenin blanc*, *Rosé* e *Cabernet sauvignon*, constatamos que todas as leveduras tiveram crescimento na fase exponencial com duração em torno de 5 a 6 dias (120 e 144 horas), com exceção da *S.cerevisiae* no mosto *Cabernet sauvignon* (Figura 3A), a qual a fase exponencial de crescimento (*log*) durou por volta de 2 dias. De acordo com Zamora, (2009) a fase *log* pode ter duração de 3 a 6 dias (72 a 144 horas).

3.1 ANÁLISE SENSORIAL- TESTE DE ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA

O teste de aceitação foi aplicado em três períodos distintos após 48 horas de fermentação para avaliar o aroma do mosto fermentado.

O mosto *Chenin blanc* fermentado pela *H.opuntiae* apresentou maior média de aceitação nos três períodos analisados(72, 96 e 120 horas) (Tabela 2).

Na fermentação cruzada conduzida pelas leveduras *H.opuntiae* e *S.cerevisae* (amostra 12), a maior média de aceitação (7,22) foi verificado no período de 120 horas não diferindo estatisticamente da amostra 9 (*H.opuntiae*). A fermentação conduzida apenas por uma estirpe de levedura comercial *S.cerevisae* variedade *bayanus* apresentou as menores médias de aceitação 4,18, 3,78 e 4,30 nos períodos de 72, 96 e 120 horas respectivamente, diferindo estatisticamente ($p<0,05$) das demais amostras testadas. King et al. (2010) observaram que o vinho produzido pela fermentação do mosto de uva *Sauvignon blanc* com duas diferentes estirpes de leveduras *S.cerevisae*, (fermentação cruzada) apresentou maior média aceitação entre os 120 julgadores.

Tabela 2. Médias de aceitação do aroma de mosto fermentado *Chenin blanc*

Período da análise sensorial	Amostras	Médias de aceitação
72 horas de fermentação	1 (<i>H.opuntiae</i>)	6,74 ^{ba}
	2 (<i>C.flavescens</i>)	5,90 ^{bc}
	3 (<i>S.cerevisae</i>)	4,18 ^d
	4 (<i>S.cerevisae</i> e <i>H.opuntiae</i>)	5,96 ^{bc}
96 horas de fermentação	5 (<i>H.opuntiae</i>)	6,78 ^{ba}
	6 (<i>C.flavescens</i>)	5,80 ^{bc}
	7 (<i>S.cerevisae</i>)	3,78 ^d
	8 (<i>S.cerevisae</i> e <i>H.opuntiae</i>)	5,52 ^c
120 horas de fermentação	9 (<i>H.opuntiae</i>)	7,30 ^a
	10 (<i>C.flavescens</i>)	2,74 ^e
	11 (<i>S.cerevisae</i>)	4,30 ^d
	12 (<i>S.cerevisae</i> e <i>H.opuntiae</i>)	7,22 ^a

Médias identificadas com letras similares não diferiram significativamente pelo teste de Tukey ($p<0,05$)

Tabela 3. Médias de aceitação do aroma de mosto fermentado *Rosé*

Período da análise sensorial	Amostras	Médias de aceitação
72 horas de fermentação	1 (<i>H.opuntiae</i>)	6,20 ^{bac}
	2 (<i>C.flavescens</i>)	6,96 ^{ba}
	3 (<i>S.cerevisae</i>)	5,70 ^{dc}
	4 (<i>S.cerevisae</i> e <i>H.opuntiae</i>)	7,16 ^a
96 horas de fermentação	5 (<i>H.opuntiae</i>)	4,76 ^d
	6 (<i>C.flavescens</i>)	2,78 ^e
	7 (<i>S.cerevisae</i>)	6,04 ^{bac}
	8 (<i>S.cerevisae</i> e <i>H.opuntiae</i>)	7,12 ^a

120 horas de fermentação	9(<i>H.opuntiae</i>)	6.14 ^{bac}
	10(<i>C.flavescens</i>)	5.84 ^{bdc}
	11(<i>S.cerevisae</i>)	5.32 ^{dc}
	12(<i>S.cerevisae e H.opuntiae</i>)	5.50 ^{dc}

Médias identificadas com letras similares não diferiram significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

O mosto Rosé fermentado pela combinação de leveduras *H.opuntiae* e *S.cerevisae* apresentou as maiores médias de aceitação (7,16 e 7,12) do aroma nos dois períodos analisados (72 e 96 horas) (Tabela 3), não diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) das amostras 1 e 9. A menor média de aceitação 2,78 foi para a amostra 6 no período de 96 horas, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) das demais amostras testadas.

Tabela 4 Médias de aceitação do aroma de mosto fermentado *Cabernet sauvignon*

Período da análise sensorial	Amostras	Médias de aceitação
72 horas de fermentação	1 (<i>H.opuntiae</i>)	4,26 ^{bc}
	2 (<i>C.flavescens</i>)	4,60 ^{bac}
	3 (<i>S.cerevisae</i>)	4,22 ^{bc}
	4 (<i>S.cerevisae e H.opuntiae</i>)	5,26 ^{ba}
96 horas de fermentação	5 (<i>H.opuntiae</i>)	4,54 ^{bac}
	6 (<i>C.flavescens</i>)	4,54 ^{bac}
	7 (<i>S.cerevisae</i>)	4,04 ^{bc}
	8 (<i>S.cerevisae e H.opuntiae</i>)	5,66 ^a
120 horas de fermentação	9 (<i>H.opuntiae</i>)	5,02 ^{ba}
	10 (<i>C.flavescens</i>)	5,24 ^{ba}
	11 (<i>S.cerevisae</i>)	3,40 ^c
	12 (<i>S.cerevisae e H.opuntiae</i>)	5,18 ^{ba}

Médias identificadas com letras similares não diferiram significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

O mosto *Cabernet sauvignon* fermentado pela combinação de leveduras *H.opuntiae* e *S.cerevisae* apresentou maiores médias de aceitação (5,26 e 5,66) nos dois períodos analisados (72 e 96 horas) (Tabela 4). Na fermentação conduzida pela levedura comercial *S.cerevisae* variedade *bayanus* foi observado as menores médias de aceitação 4,22, 4,04 e 3,40 nos períodos de 72, 96 e 120 horas respectivamente, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) das amostras de maiores médias de aceitação (amostras 4 e 8).

A formação do aroma no vinho pode ser derivada da uva, do processo fermentativo ou do envelhecimento do vinho. Durante a fermentação ocorre à ação da β -glicosidade, esta enzima é sintetizada pelas células intactas e viáveis de leveduras apiculadas, a exemplo das *Hanseniaspora* spp. e *Klockera* spp., assim como as *Saccharomyces cerevisiae* podendo contribuir para hidrólise de glicosídeos presentes nos mostos, influenciando nas características aromáticas do vinho pela liberação dos compostos aromáticos primários inativos, transformando-os em compostos aromáticos ativos. Estudos vêm sendo realizados, sugerindo que as espécies de leveduras não-*Saccharomyces*, a exemplo das *Hanseniasporas* são mais eficientes na síntese de glicosidases quando comparada as *Saccharomyces* (FIA; GIOVANI; ROSI, 2005).

As Figuras 4 a 6 apresentam os resultados das médias da intenção de compra relacionadas aos aromas semelhantes ao vinho Branco, Rosé e Tinto fermentado pelas leveduras *H.opuntiae*, *C.flavescens*, *S.cerevisiae* e pela combinação de leveduras (*H.opuntiae* e *S.cerevisiae*).

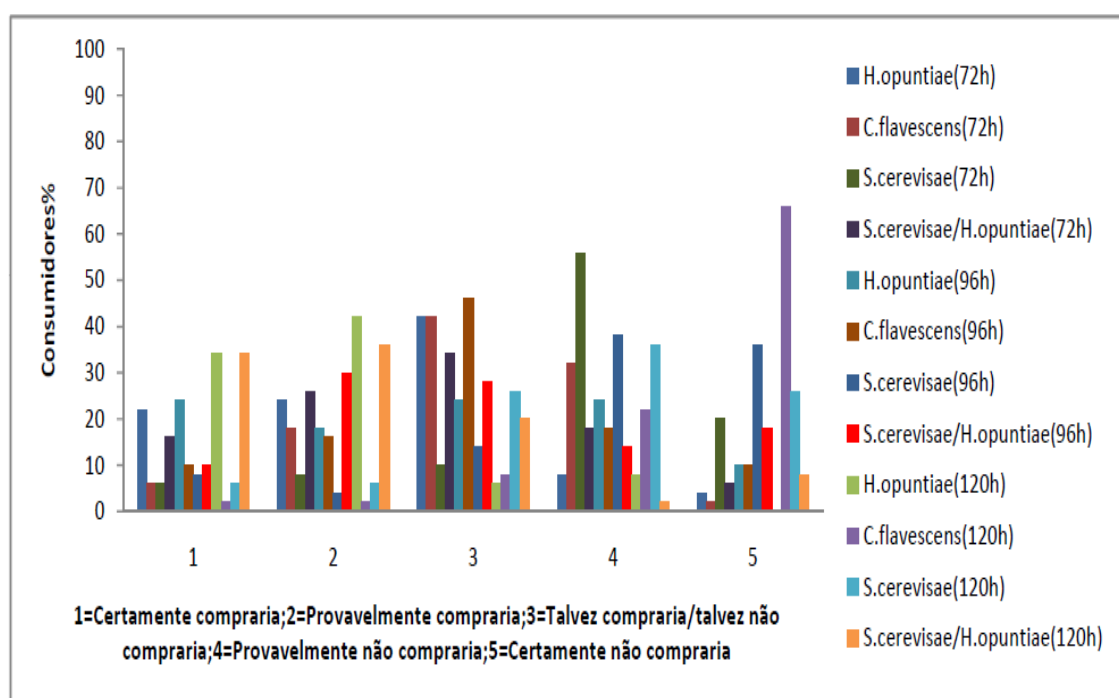


Figura 4: Intenção de compra da amostra de vinho *Chenin blanc* no período de 72, 96 e 120 horas da análise sensorial

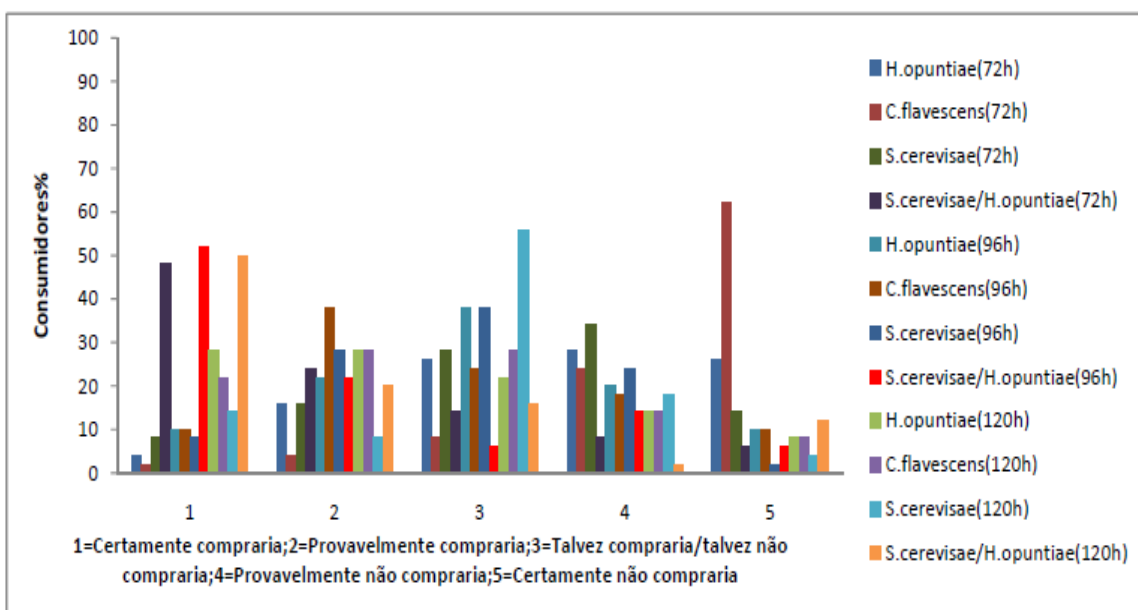


Figura 5: Intenção de compra da amostras de vinho *Rosé* no período de 72,96 e 120 horas da análise sensorial.

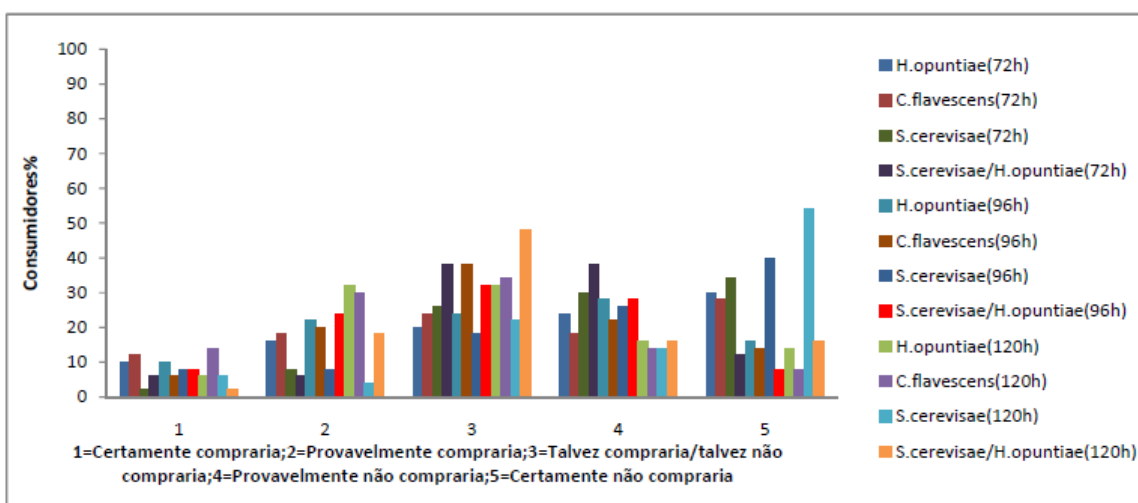


Figura 6: Intenção de compra das amostra de vinho *Cabernet sauvignon* no período de 72, 96 e 120 horas da análise sensorial.

Para o aroma do mosto *Chenin blanc* fermentado pelas leveduras *H.opuntiae* e pela combinação entre a *H.pountiae* e *S.cerevisae* foram as amostras que obtiveram a maior percentagem de intenção de compra para a soma dos conceitos “certamente compraria” e “provavelmente compraria”, com 76% e 70% respectivamente, no período de 120 horas (Figura 4), estas amostras também tiveram maior média de aceitação nestes períodos.

No mosto *Rosé* (Figura 5) as amostras do mosto fermentado pela combinação de leveduras *H.opuntiae* e *S.cerevisae* obtiveram a maior

percentagem de intenção de compra para a soma dos conceitos “Certamente compraria e provavelmente compraria”, nos períodos de 72 e 96 horas, com valores de 72% e 74%, respectivamente.

O mosto *Cabernet sauvignon* (Figura 6) fermentado pelas leveduras *H.opuntiae* e *S.cerevisae* apresentou a maior percentagem de intenção de compra (32%) para a soma dos conceitos “Certamente compraria e provavelmente compraria”, no período de 96 horas.

Mamede, Cardelo e Pastore (2005), avaliaram a aceitabilidade e intenção de compra dos mostos *Chardonnay* e *Pinot noir* fermentado a 15°C pelas leveduras *Pichia membranefaciens*, *Kloeckera apiculata*, *Candida valida* e *S. cerevisae*. As maiores médias de aceitação das amostras e intenção de compra foram para os mostos *Pinot noir* e *Chardonnay* fermentado pela *Pichia membranefaciens* e *Kloeckera apiculata* (5,50 e 5,43) respectivamente, em seguida a maior média de aceitação foi para o mosto *Chardonnay* fermentado pela *Kloeckera apiculata* (5,42). A maior intenção de compra foi para amostra de mosto *Pinot noir* fermentado pela *P. membranefaciens* 35,5% e 32,5% para o mosto *Chardonnay* fermentado pela *P. membranefaciens* e pela *K.apiculata*. O mosto *Chardonnay* fermentado pela *S. cerevisae* apresentou baixa aceitabilidade (4,00) e intenção de compra (\cong 20%). Os resultados de intenção de compra estavam de acordo com as médias de aceitação do aroma dos mostos fermentados.

Neste estudo as análises dos gráficos demonstraram que os resultados de intenção de compra também estão de acordo com as médias de aceitação do aroma dos mostos fermentados, mostrando que as amostras que obtiveram as maiores médias de aceitação foram as de maiores percentagens de intenção de compra para a soma dos conceitos “certamente compraria” e “provavelmente compraria”.

Os resultados deste estudo indicaram que as maiores médias de aceitação e de intenção de compra para os aromas de vinho *Chenin blanc*, *Rosé* e *Cabernet sauvignon* foram nos períodos que correspondeu a fase de crescimento exponencial das leveduras durante o processo fermentativo. Neste período de crescimento, ocorreu a síntese máxima de biomassa celular, podendo está associado à maior atividade enzimática das leveduras e liberação de

compostos voláteis (CHAROENCHAI; FLEET; HENSCHKE, 1998). Em experimento realizado por Molina et al. (2007) a maioria dos compostos aromáticos voláteis foram sintetizados durante a fase de crescimento exponencial das leveduras inoculadas nas fermentações realizadas a 15 e 28°C.

Muitos estudos têm sido realizados utilizando culturas mistas de leveduras não-*Saccharomyces* e *Saccharomyces* durante o processo fermentativo para produção de vinho, revelando assim o aumento das concentrações de compostos voláteis desejáveis e contribuindo para a qualidade do produto. Velazquez et al.(1991) reportam para os benefícios da utilização de leveduras apiculadas selecionadas para a síntese de produtos aromáticos desejáveis. De acordo com Romano et al. (1997), cepas selecionadas de leveduras apiculadas podem favorecer a formação de aroma e sabor particular para vinhos e outras bebidas alcoólicas.

4 CONCLUSÃO

A fermentação do mosto *Chenin blanc* a 15°C conduzida pela levedura *H. opuntiae* apesar de ter promovido baixo valor de biomassa celular teve a maior média de aceitação e intenção de compra. Este resultado pode ter sido atribuído ao maior teor de nitrogênio no mosto *Chenin blanc* o qual foi convertido em compostos aromáticos ativos;

A *H. opuntiae* apresentou melhor potencial para produção de aroma. A fermentação cruzada entre as leveduras *H. opuntiae* e *Saccharomyces cerevisiae* nos mostos *Chenin blanc*, *Rosé* e *Cabernet sauvignon* também tiveram maiores médias de aceitação do aroma e intenção de compra entre os julgadores, ficando evidente a contribuição desta levedura indígena não-*Saccharomyces* na síntese de compostos aromáticos;

Estudos referentes a outros parâmetros da cinética da fermentação e análise sensorial discriminativa de aroma e sabor de mostos fermentados pela *H. opuntiae* podem ser realizados para futura utilização desta levedura na produção de vinho de qualidade na região do Vale do Submédio São Francisco.

REFERÊNCIAS

BERNABÉU, R.; BRUGAROLAS, M.; MARTÍNEZ-CARRASCO, L.; DÍAZ M. Wine origin and organic elaboration, differentiating strategies in traditional producing countries. **British Food Journal**, v. 110, n. 2, p. 174-188, 2008.

BEROVIC, M.; MAVRIN, J.; WONDRA, M.; KOSMERL, T.; BAVCAR, D. Influence of Temperature and Carbon Dioxide on Fermentation of Cabernet Sauvignon Must. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, n.4, p. 353–35.2003.

BISSON, L.F. Stuck and sluggish fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, n. 1, p.107-119.1999.

CARDONA, F.; CARRASCO, P.; PÉREZ-ORTÍN, J.E.; DEL OLMO, M.; ARANDA, A. A novel approach for the improvement of stress resistance in wine yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v, 114, n. 1, p. 83–91.2007.

CHAROENCHA, C.; FLEET, G. H.; HENSCHKE, P. Effects of Temperature, pH, and Sugar Concentration on the Growth Rates and Cell Biomass of Wine Yeasts. **American Journal of Enology and Viticulture**, v, 49, n. 3, p.283-288.1998.

FERREIRA, J. Factors influencing the fermentation performance of commercial wine yeasts. In: FERREIRA, J. **LITERATURE REVIEW: FACTORS INFLUENCING FERMENTATION EFFICIENCY DURING WINEMAKING**, 2004. chapter 2, p.4-25,.

FIA, G.; GIOVANI, G.; ROSI, I. Study of b-glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. **The Society for Applied Microbiology. Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 509–517.2005.

FLEET, G.H.; HEARD, G.M Yeast-growth during fermentation. In: FLEET, G.H. **Wine Microbiology and Biotechnology**, Harwood Academic Publishers, 1993. chapter 2, p. 27–54.

FRANCESCA, N.; CHIURAZZI, M.; ROMANO, R.; APONTE, M.; SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Indigenous yeast communities in the environment of “Rovello bianco” grape variety and their use in commercial white wine fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 337–351, 2010.

FUGELSANG, K.C.; EDWARDS, C.G. **WINE MICROBIOLOGY: Practical Applications and Procedures**, Second edition. Springer, 380p, 2007.

GIL, J.M.; SÁNCHEZ, M. Consumer preferences for wine attributes: a conjoint approach. **British Food Journal**, v.99, n.1, p. 3-11, 1997.

HEARD, G.M; FLEET, G.H. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 65, p.23–28, 1988.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA: Relatório de estação Geodésica. Brasil. p.1, 2006.

_____: Relatório de estação Geodésica. Basil. 1p, 2011.

IAL-INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo, 4 ed, v. 1, p. 384-440, 2004.

JACKSON, R. S. **Wine Science: Principles, Practice, Perception**. San Diego, Second edition, Academic Press, 2000. 665 p.

JACKSON, R. S. **Wine Science: Principles, Practice, Perception**. San Diego, Third edition, Academic Press, 2008.702p.

JOLLY, N.P.; AUGUSTYN O.P.H.; PRETORIUS I.S.. The Effect of Non-*Saccharomyces*Yeasts on Fermentation and Wine Quality. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 24, n. 2, p.55-62, 2003.

KING, E.S.; KIEVT, R.L.; CURTIN, C.; SWIEGERS, J.H.; PRETORIUS, I.S.; BASTIAN, S.E.P.; FRANCIS, I.L. The effect of multiple yeasts co-inoculation on Sauvignon blanc wine aroma composition, sensory properties and consume preference. **Food chemistry**, v.122, p.618-626, 2010.

KUNKEE, R.E. Relationship between nitrogen content of must and sluggish fermentation. In:Proceedings of the International Symposium of Nitrogen in Grapes and Wine. **American Society of Enology and Viticulture**, p. 148–155, 1991.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) Ribossomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.73, n.4, p.331-371, 1998.

MAMEDE, M.E.O.; PASTORE G.M. Avaliação da produção dos Compostos majoritários da Fermentação de Mosto de Uva por Leveduras Isoladas da Região da “Serra Gaúcha” (RS). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 453-458, 2004.

MAMEDE, M. E.O; CARDELLO, H.M.A.B; PASTORE ,G.M. Evaluation of an aroma similar to that of sparkling wine: Sensory and gas chromatography analyses of fermented grape musts. **Food Chemistry**, v.89, n.1, p.63-68, 2005.

MANDELLI, F.; ZANUS, M.C. O Clima e a Safra Vitícola.In:GUERRA, C.C.; MANDELLI, F.;TONIETTO, J.; ZANU, M.C.; CAMARGO, U.A. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**, Bento Gonçalves, Embrapa, 2009.n.48,p.31-38.

MANGINOT, C.; ROUSTAN, J.L.; SABLAYROLLES, J.M. Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.23, n (7-8), p.511-517.1988.

MARKS, V.D.; VAN DER MERWE, G.K.; VAN VUUREN, H.J.J. Transcriptional proling of wine yeast in fermenting grape juice:regulatory effect of diammonium phosphate. **FEMS Yeast Research**, v.3, n. 3, p. 269-287.2003.

MEILGAARD, C.M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. Affective Tests: Consumer Tests and In- House Panel Acceptance Tests. In: MEILGAARD, C.M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. , Fourth edition, CRC Press, Taylor and Francis group, 2007.chapter 12, p. 255- 311.

MOLINA, A.M.; SWIEGERES,J.H.;VARELA, C.; PRETORIUS, I. S.; AGOSIN, E. Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.77, n. 3, p.675–687.2007.

NISIOTOU, A.A.; NYCHAS, G.J.E. Yeast Populations Residing on Healthy or *Botrytis*-Infected Grapes from a Vineyard in Attica, Greece. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.8, p.2765-2768, 2007.

PAMPULHA, M. E; LOUREIRO- DIAS,M.C. Combined effect of acetic acid, pH, and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. (5-6), p.547-550, 1989.

RIBÉREUA-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONECHÉ, B.; LONVAUND, A. **Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications**, Second edition, John Wiley & Sons Ltda, v.1, 445p, 2006.

RÉVILLION, J.P.P.; FLÔRES, S.H.; WILK, E.O.; BADEJO, M.S.; DOMENEGHINI, G. M.; GANDOLFI, L.M.; ALLES, M.J.L.; MARIOT, R.F.; CAMPOS, S.U.; ALBERTI, S.S.; ROMERO, A.M. Qualidade sensorial de vinhos tintos finos do Rio Grande do Sul comparados aos importados da Argentina e Chile. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.1, p.177-180, 2007.

ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal Food Microbiology**, v.86, n. (1-2), p. 169–180, 2003.

ROMANO, P.; SUZZI, G.; COMI, G.; ZIRONI, R.; MAIFRENI, M. Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v.82, n. 5, p. 615-618, 1997.

SAN- JUAN, F.; FERREIRA, V.; CACHO, J.; ESCUDERO, A. Quality and Aromatic Sensory Descriptors (Mainly Fresh and Dry Fruit Character) of Spanish Red Wines can be Predicted from their Aroma-Active Chemical Composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v, 59, n. 4, p.7916-7924.2011.

SUN, H.; MA, H.; HAO, M.; PRETORIUS, I.S.; CHEN, S. Identification of yeast population dynamics of spontaneous fermentation in Beijing wine region, China. **Annals of Microbiology**, v.59 n.1 p 69-76, 2009.

SERRA, A.; STREHAIANO, P.; TAILLANDIER, P. Influence of temperature and pH on *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* growth; impact of a wine yeast interspecific hybridization on these parameters. **International Journal of Food Microbiology**, v.104,n. 3, p.257-265,2005.

VELAZQUEZ, J.; LONGO, E.; SIEIRO, C.; CANSADO, J.; CALO, P.; VILLA, T. Improvement of the alcoholic fermentation of grape juice with mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* wild strains. Negative effect of *Kloeckera apiculata*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, n. 4, p.485-489.1991.

VIEIRA, A.T.; MELO F.; LOPES, H.B.V.; CAMPOS, J.C.V.; BONFIM, L.F.C.; COUTO, P.A.A.; PINOTTI, S.M. **Projeto Cadastro de fonte de Abastecimento por água subterrânea. Diagnóstico do município de Casa Nova - Bahia. Brasil.** Ministério de Minas e Energia, p.1-28, 2005.

ZAMORA, F. Biochemistry of Alcoholic Fermentation. In: MORENO, M.VA; POLO, M.C. **Wine Chemistry and Biochemistry**, Springer, 2009. chapter, p 3-26.

ZHUGE, B.; GUO, XN.; MAWADZA, C.; FANG, HY.; TANG, XM.; ZHANG, XH.; ZHUGE, J. Novel *Candida glycerinogenes* mutant with high glycerol productivity in high phosphate concentration medium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n.4, p.453–456, 2005.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In:KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The Yeasts, A Taxonomic Study**. Fourth edition. Elsevier Science BV, Amsterdam, Cap 11, p.75-107, 1998.

CONCLUSÕES GERAIS

Dentre o perfil populacional das leveduras indígenas isoladas das oito variedades de uvas frescas *Vitis viniferas* L. coletadas nas três regiões vinícolas da Região do Vale Submédio São Francisco foi predominante as do gênero *Hanseniaspora* spp. o que reflete a capacidade de adaptação destas leveduras a região.

A *H.opuntiae* não apresentou declínio da biomassa celular no final das 168 horas da fermentação alcoólica em todos os mostos analisados, o que pode sugerir a resistência desta levedura a fatores de estresse inerentes aos mostos e extrínsecos, referentes ao processo.

A temperatura influenciou na formação de biomassa celular das leveduras, sendo que o maior valor de biomassa foi alcançado à temperatura de 25°C, o pH não exerceu influência na síntese da biomassa celular.

A levedura não-*Saccharomyces H.opuntiae* contribuiu de forma efetiva para a produção de compostos aromáticos ativos.

**APÊNDICE A-Modelo de Termo de Consentimento Livre e Pré-esclarecido
apresentado aos julgadores interessados em participar da pesquisa**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E PRÉ-ESCLARECIDO
Obrigatório para Pesquisa Científica em Seres Humanos – Resolução
nº094/ 2009(Conselho Nacional de Saúde)

**Comitê de ética em pesquisa – CEP/COM/UFBA
Maternidade Climério de Oliveira
Universidade Federal da Bahia**

O Laboratório de Análise Sensorial da Faculdade de Farmácia da UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA está realizando uma pesquisa referente ao aroma de Vinho Branco, Rosé e Tinto produzido a partir da fermentação do mosto de uva por meio das leveduras isoladas e identificadas de uvas *Vitis viníferas* L. da região do Vale Submédio São Francisco. A fim de decidir se você deseja participar deste estudo sensorial, você deve entender os riscos e benefícios que esta análise pode oferecer, para poder fazer um julgamento informado. Este processo é chamado Termo de Consentimento Livre e Pré-Esclarecido.

É importante ressaltar que a sua participação neste estudo é voluntária e, se desejar o Sr(a) poderá desistir a qualquer momento.

Asseguramos que, ao participar deste estudo, os seus dados pessoais e suas repostas serão mantidos em sigilo.

Informamos ainda que não haverá nenhuma multa ou cobrança de ônus caso queira desistir da pesquisa.

A equipe do laboratório se coloca à sua disposição, bem como à de seus familiares, para esclarecer quaisquer dúvidas, seja antes de iniciá-lo ou durante a sua execução.

Após assinado, uma cópia deste documento será anexada ao seu prontuário e outra ficará com o pesquisador. **O estudo que está sendo proposto chama-se:**

Projeto:

Investigação das leveduras de uvas cultivadas no Vale do Submédio São Francisco e sua utilização na fermentação do Mosto de uva.

JUSTIFICATIVA

A pretensão desta pesquisa é estudar o comportamento fermentativo e o perfil aromático das leveduras pertencentes as cultivares de uvas *Vitis vinifera* L. produzidas na região do Vale do Submédio São Francisco que poderão ser empregadas em processo biotecnológico de produção de vinho. Dessa forma a relevância do referido estudo se explica a partir dos seus aspectos produtivos regionais, do pouco conhecimento científico das leveduras que compõem as espécies existentes na região e da contribuição para ampliar a literatura existente sobre o tema.

Atualmente a região do Vale Submédio São Francisco se destaca na produção de diferentes cultivares de uvas destinados ao processamento de vinhos finos no Brasil. A produção de vinho nesta região iniciou-se na década de 80, com os produtores interessados

em oferecer vinhos que apresentassem maior complexidade de aromas e sabores, que redundariam em vinhos mais finos e palatáveis.

Um dos aspectos mais importantes na produção de vinho é garantir a qualidade sensorial, a qual pode ser influenciada por vários fatores, dentre eles se destaca as leveduras fermentadoras típicas do ecossistema natural das uvas ou presentes no ambiente de processamento do vinho.

Até o momento não há citação na literatura científica que aborde a utilização de leveduras indígenas na região do Vale Submédio São Francisco que tiveram uso em processos Biotecnológicos.

OBJETIVO DO ESTUDO

Estudar o comportamento fermentativo das espécies de leveduras isoladas e identificadas de uvas *Vitis viniferas* L cultivadas na região do Vale Submédio São Francisco que apresentam potencial para produção de aroma em mosto de uva.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Após termo de consentimento livre e pré-esclarecido, os julgadores que irão participar do estudo, terão que analisar o aroma de vinho Branco, Rosé e tinto. As análises serão realizadas em cabines individuais e as amostras serão servidas em taças tipo tulipa de vidro. A quantidade das amostras dos mostos fermentados será de 50 mL para cada julgador.

Serão levantados dados para recrutamento de participantes baseado na disponibilidade de tempo para análise, na acessibilidade, na faixa etária, ao consumo do produto, entre outros. Também será levada em consideração a doenças e princípios alérgicos com os produtos a serem analisados, por meio de questionários apropriados e desenvolvidos para análise sensorial de alimentos e bebidas.

AVALIAÇÃO DO GRAU DE RISCO

Todos os procedimentos da pesquisa não acarretarão riscos de contaminação para os participantes, nem qualquer tipo de problema para sua saúde. Os métodos de análise sensorial a serem seguidos são utilizados mundialmente pelas instituições de pesquisa nacional e internacional, não tendo ocorrido nenhum tipo de problema que pudesse prejudicar a saúde dos participantes.

BENEFÍCIOS DO ESTUDO

Identificar por meios dos testes sensoriais o perfil aromático das leveduras indígenas identificados em cultivares de uvas *Vitis vinifera* L.



**APÊNDICE B – Modelo de Termo de Consentimento pós-informação
preenchido pelos julgadores interessados em participar da pesquisa**

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu, abaixo assinado, de nome

_____, maior de
dezoito anos confirmo que fui informado
por _____

Quanto aos riscos, vantagens, e possíveis efeitos adversos que possam ser
resultantes da pesquisa.

Apresento, pois, meu livre consentimento para participar deste estudo. Posso,
a qualquer momento, optar por abster-me dele, sem motivo especial, e sem qualquer
prejuízo aos cuidados que tenho o direito de receber.

Nome: _____
Endereço: _____
Telefone: _____
E-mail: _____
Assinatura: _____
Data: ____/____/____

Pesquisador:

Nome: _____
Endereço: _____
Telefone: _____
E-mail: _____
Assinatura: _____
Data: ____/____/____

Salvador, ____/____/2011

Lido e Aprovado,

NOME

Assinatura

Mariana Oliveira Assis

Assinatura

APÊNDICE C– Modelo de questionário utilizado para o recrutamento de Julgadores



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS
DATA __ / __ / __

RECRUTAMENTO DE JULGADORES PARA VALIAÇÃO DE AROMA DE VINHO

Neste momento desejamos formar uma equipe de julgadores para Análise Sensorial do Aroma semelhante ao vinho Branco, Rosé e Tinto produzido pela fermentação do mosto de uva Trata-se de uma atividade que representa uma das etapas de um trabalho investigativo, desenvolvido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, que objetiva estudar o comportamento fermentativo de leveduras de uvas *Vitis vinifera* L. da região do Vale do Submédio São Francisco. Assim, esta etapa tem como objetivo avaliar o aroma resultante desta fermentação. Pretende-se reunir apreciadores de vinho, para participarem voluntariamente desta atividade. Sua identificação será mantida em sigilo. Caso você concorde em participar, deverá assinar o termo de concordância (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação nesta atividade) e responder a esta ficha de identificação.

Nome Completo: _____
Idade (em anos completos) _____
Profissão _____
Endereço: _____
Telefones para contato: _____
E-mail: _____

A análise sensorial será realizada nos dias e horários estabelecidos abaixo para atender aos requisitos metodológicos das diferentes fases de fermentação do mosto.

Terça-feira (13h às 17:00h);

Quarta-feira (13h às 17:00h);

Quinta-feira (13h às 17:00h).

O Sr (a) é fumante? Sim () Não ()

O Sr (a) consome álcool todos os dias? Sim () Não ()

O Sr (a) está gripado ou resfriado neste exato momento? Sim () Não ()

O Sr.(a) faz uso constante de medicamento anti-depressivo? Sim () Não()

Com que frequência o Sr (a) toma vinho:

() 1 vez por semana

() 15 em 15 dias

() 1 vez por mês

O Sr (a) é portador de algumas dessas doenças?

Alergia alimentar Sim () Não () Se sim, qual _____

Renite alérgica Sim () Não ()

Sinusite Sim () Não ()

Faringite Sim () Não ()

Amidalite Sim () Não()

Pólipo Nasal Sim () Não ()

Transtorno do olfato Sim () Não ()

Obstrução nasal Sim () Não ()



APÊNDICE D - Modelo de ficha para o Teste de Aceitação e Intenção de Compra

Universidade Federal da Bahia

Faculdade de Farmácia

Departamento de Análises Bromatológicas

Mestrado Acadêmico em Ciência de Alimentos

Ficha de Aceitação Sensorial e Intenção de Compra

Nome: _____

Idade: _____

Sexo: M () F ()

Data: _____

1) Por favor, avalie o aroma do mosto fermentado de uva semelhante ao vinho Branco, Rosé e Tinto das amostras codificadas da esquerda para a direita e utilize a escala abaixo para registrar o quanto você gostou ou desgostou das amostras.

- 9-gostei muitíssimo
- 8-gostei muito
- 7-gostei moderadamente
- 6-gostei ligeiramente
- 5-nem gostei/nem desgostei
- 4-desgostei ligeiramente
- 3-desgostei moderadamente
- 2-desgostei muito
- 1-desgostei muitíssimo

Amostra (código)	Nota

2) Por favor, com relação a intenção de compra, se estas amostras estivesse á venda, você:

- 1 – Certamente compraria
- 2 – Provavelmente compraria
- 3 – Talvez compraria / Talvez não compraria
- 4 – Provavelmente não compraria
- 5 – Certamente não compraria

Amostra (código)	Nota

Justificativa(opcional):

ANEXO 1- Imagens do processo de Identificação bioquímica/ fisiológica de algumas leveduras isoladas de uvas *Vitis viniferas* L. da Região do Vale do Submédio São Francisco.



Foto 1



Foto 2



Foto 3



Foto 4

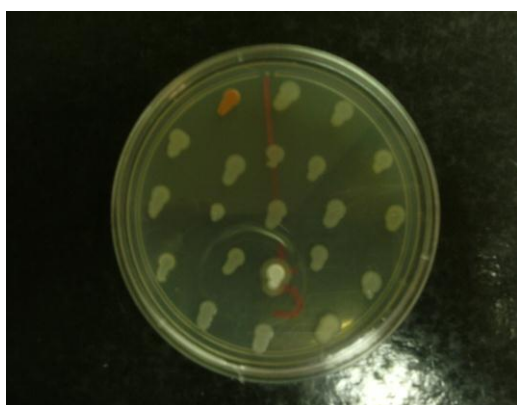


Foto 5



Foto 6

Foto de 1 a 4. Ativação das leveduras em meio de cultura ágar YM, antes do processo de identificação fisiológica . Fotos 5 e 6. Procedimento da Identificação Fisiológica de 21 leveduras (Etapa inicial- Assimilação de Glicose. Todas as leveduras apresentaram crescimento positivo neste meio).

Fonte: Ilustração realizada no Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Leveduras-UFMG em dezembro de 2011 pela autora da pesquisa.