

Universidade Federal de São Carlos

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia
Molecular
Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada

Hosana Ribeiro de Novaes

**Seleção e caracterização molecular e fermentativa de leveduras
personalizadas para a produção de vinhos brasileiros**

São Carlos – SP

2021

Hosana Ribeiro de Novaes

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

São Carlos – SP

2021

Novaes, Hosana Ribeiro de

Seleção e caracterização molecular e fermentativa de leveduras personalizadas para a produção de vinhos brasileiros / Hosana Ribeiro de Novaes -- 2022.
91f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Prof. Dr. Anderson Ferreira da Silva

Banca Examinadora: Prof. Dr. Anderson Ferreira da Silva, Prof. Dr. Adilson José da Silva, Prof. Dr. Thiago Olitta Basso

Bibliografia

1. Isolamento de Leveduras Nativas. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Vinificação. I. Novaes, Hosana Ribeiro de. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Ronildo Santos Prado - CRB/8 7325



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

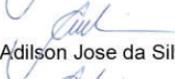
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Hosana Ribeiro de Novaes, realizada em 04/03/2022.

Comissão Julgadora:


Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha (UFSCar)


p/ Prof. Dr. Adilson Jose da Silva (UFSCar)


p/ Prof. Dr. Thiago Olitta Basso (USP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Agradecimentos

A Deus por ter-me capacitado para realizar as etapas necessárias para concretizar meu objetivo.

Aos meus filhos pela compreensão, onde muitas vezes me ausentei do meu papel de mãe para realizar os experimentos que se estendiam por noites e também aos finais de semana. Obrigada meus filhos amados por estarem sempre ao meu lado para que eu conseguisse alcançar meu objetivo.

Ao Diogo, por mostrar que eu era capaz a cada momento que pensava em desistir e pela paciência, quando muitas vezes não pude lhe dar a atenção que esperava.

Ao Prof. Dr. Anderson que me ajudou nessa caminhada, orientando, compartilhando sua sabedoria e a cima de tudo confiando no meu trabalho.

À vinícola Terrassos por ceder seu espaço fabril, e acreditar no projeto proposto o que tornou possível colocá-lo em prática.

Ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular e ao Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada pela oportunidade de realizar o projeto.

À CAPES, pelo fomento concedido a estudante.

*“A missão não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda
pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer

Resumo

A produção de vinho no Brasil vem se destacando com vinhos de alta qualidade premiados ao redor do mundo. No entanto, ainda são necessárias grandes mudanças para que nosso país possa competir com outras vinícolas no mundo. Dentre elas, pode-se destacar o uso de leveduras selecionadas e adaptadas às uvas plantadas em solo brasileiro. De modo que possam, além de metabolizar os açúcares presentes nas uvas, também produzirem compostos metabólicos primários e secundários cruciais para a elaboração de um vinho típico de qualidade *premium*. No mercado brasileiro encontra-se apenas cepas de leveduras comerciais adquiridas de fornecedores internacionais, já que o Brasil não dispõe deste recurso. O uso destas leveduras comerciais no processo de vinificação não proporciona ao vinho característica organoléptica próprias, uma vez que essas cepas, por não serem selecionadas em solo brasileiro, não possuem as vias metabólicas adaptadas e necessárias para aumentar a tipicidade dos vinhos locais. Observando este cenário o presente projeto acompanhou a dinâmica de microrganismos, durante 3 colheitas/produção tanto nas videiras como durante o processo fermentativo, em uma vinícola da região de Amparo-SP, visando a seleção de leveduras nativas para atuar como iniciadoras (*starters*) no processo fermentativo. Um processo similar foi realizado em escala laboratorial em janeiro de 2019 utilizando o mosto que estava sendo vinificado na vinícola com o intuito de comparar ambos processos fermentativos. Através deste monitoramento isolamos 406 leveduras, sendo, 347 leveduras não-*Saccharomyces* que após sequenciamento da região ITS identificamos que estavam distribuídas em 23 diferentes espécies e 65 *Saccharomyces*. Ao realizar as análises de genotipagem nestas linhagens de *Saccharomyces* isoladas, 5 demonstraram serem diferentes entre si e também diferentes das linhagens comerciais comumente utilizadas para a produção de vinhos no Brasil. Sendo, portanto, novas linhagens isoladas. As demais linhagens apresentaram o mesmo perfil de amplificação das cepas comerciais e das 5 novas cepas identificadas. Partindo dessas análises verificamos também que as linhagens de *Saccharomyces* isoladas no ambiente vitivinícola participavam ativamente do processo fermentativo. Estas novas linhagens, foram submetidas a análises fisiológicas para verificar sua capacidade e desempenho na produção de vinhos. Em todas as análises realizadas elas demonstraram desempenho igual e em alguns casos superior ao das cepas comerciais. Essas linhagens já seriam naturalmente mais adaptadas ao processo fermentativo e poderiam trazer características peculiares para a produção de vinhos, contribuindo para a elaboração de uma bebida distinta. Além disso, um entendimento da microbiota de leveduras presente tanto na vinícola quanto no processo fermentativo pode auxiliar em um melhor entendimento da dinâmica de sucessão destes microrganismos, sendo um elemento importante na caracterização do *terroir* do vinho nacional, preservando-se assim sua identidade histórica, qualidade e procedência geográfica.

Palavras chave: Leveduras. *Terroir*. Vitivinícola. Vinho. *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentação. Terrassos.

Abstract

Brazilian wine production has been standing out with high quality awarded wines around the world. However, major changes are still needed so that our country can compete with other wineries in the world. Among them, we can highlight the use of selected yeasts adapted to grapes planted in Brazilian soil. So that they can, in addition to metabolizing the sugars present in the grapes, produce primary and secondary metabolic compounds crucial for the elaboration of a typical premium quality wine. In the Brazilian market there are only commercial yeast strains acquired from international suppliers, due to Brazil does not have this resource. The use of these commercial yeasts in the winemaking process does not provide the wine with its own organoleptic characteristics, since these strains, because they are not selected on Brazilian soil, do not have the adapted metabolic pathways necessary to increase the typicality of local wines. Observing this scenario, the present project followed the dynamics of microorganisms during 3 harvests/production both in the vines and during the fermentation process, in a winery in the region of Amparo-SP, aiming at the selection of native yeasts to act as initiators (starters) in the fermentation process. A similar process was carried out on a laboratory scale in January 2019 using the must grape that was being vinified at the winery in order to compare both fermentation processes. Through this monitoring, we isolated 406 yeasts from both processes, being 347 non-*Saccharomyces* yeasts that, after sequencing the ITS region, we identified that they were distributed in 23 different species and 65 *Saccharomyces*. When performing genotyping analyzes on these isolated *Saccharomyces* strains, 5 they were shown to be different from each other and also different from the commercial strains commonly used for wine production in Brazil. Therefore, they are new isolated strains. The other strains showed the same amplification profile of the commercial strains and the 5 new identified strains. The analyses also verified that the isolated *Saccharomyces* strains isolated in the winery environment actively participated in the fermentation process. These new strains were submitted to physiological analyzes to verify their capacity and performance in wine production. In all analyzes realized, they showed performance equal to or superior to that of commercial strains. These strains would already be naturally more adapted to the fermentation process and could bring peculiar characteristics to the production of wines, contributing to the elaboration of a distinct drink. In addition, an understanding of the yeast microbiota present both in the winery and in the fermentation process can help to better understand the succession dynamics of these microorganisms, being an important element in the characterization of the national wine's terroir, thus preserving its historical identity, quality and geographical origin.

Key words: Yeasts. *Terroir*. Winery. Wine. *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentation. Terrassos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 História do vinho	1
1.2 Vinícola Terrassos	1
1.3 Produção do vinho	2
1.3.1 Leveduras e a produção de vinhos	2
1.3.2 Sulfitação do mosto.....	4
1.4 Microbiota vitivinícola e o isolamento de leveduras nativas.....	4
1.5 Taxonomia das leveduras.....	5
1.6 Leveduras selvagens	5
1.7 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
1.8 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> comerciais	6
1.9 Características fisiológicas das leveduras não- <i>Saccharomyces</i>	7
1.10 Metabolismo das leveduras e a produção de compostos	8
1.10.1 Álcoois superiores	10
1.10.2 Ácido acético.....	11
1.10.3 Ésteres	11
1.10.4 Compostos sulfurados	12
1.10.5 Sulfeto de hidrogênio H ₂ S.....	12
2 OBJETIVO.....	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivo específicos.....	14
3 MÉTODOS.....	15
3.1 Isolamento de leveduras do ambiente de produção do vinho	15
3.2 Análise da composição e sucessão de leveduras ao longo do processo fermentativo na vinícola.	15
3.3 Análise do consumo de açúcares totais pela técnica do ácido-dinitrosalicílico: ..	16
3.4 Identificação leveduras do gênero <i>Saccharomyces</i>	17
3.5 Identificação molecular e caracterização das linhagens	18
3.5.1 Extração do DNA:.....	18
3.5.2 Amplificação da região ITS:	18
3.5.3 Análises de genotipagem.....	19
3.5.4 Alinhamento e análises filogenéticas das cepas isoladas	19

3.6	Análise da capacidade de crescimento das <i>Saccharomyces</i> isoladas em mosto de uva Syrah	20
3.7	Análise da capacidade de crescimento das cepas de <i>Saccharomyces</i> isoladas em meio contendo metabissulfito de potássio	20
3.8	Produção de sulfeto de hidrogênio (H ₂ S).....	21
3.9	Caracterização das cepas de <i>Saccharomyces</i> isoladas resistentes a diferentes concentrações de glicose.....	21
3.10	Caracterização das cepas de <i>Saccharomyces</i> isoladas resistente a etanol	22
3.11	Identificação das cepas de leveduras termotolerantes	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1	Isolamento de leveduras do ambiente de produção do vinho	24
4.1.1	Coleta e seleção das linhagens	24
4.1.2	Identificação molecular e caracterização das linhagens.....	27
4.1.3	Identificação das cepas de leveduras não- <i>Saccharomyces</i> que colonizam o ambiente vitivinícola	29
4.1.3.1	Cepas de leveduras não- <i>Saccharomyces</i> identificadas na colheita de junho de 2018	30
4.1.3.2	Cepas de leveduras não- <i>Saccharomyces</i> identificadas na colheita de janeiro de 2019	31
4.1.3.3	Cepas de leveduras não- <i>Saccharomyces</i> identificadas na colheita de junho de 2019	32
4.1.4	Análise da relação evolutiva das cepas de leveduras não- <i>Saccharomyces</i> que colonizam o ambiente vitivinícola	34
4.1.5	Análise dos resultados	38
4.2	Isolamento e caracterização de leveduras ao longo do processo fermentativo da vinícola.....	38
4.2.1	Dinâmica de leveduras durante o processo fermentativo.....	39
4.2.2	Análise do consumo de açúcares totais ao longo do processo fermentativo..	42
4.2.3	Identificação das espécies de leveduras não- <i>Saccharomyces</i> que participam do processo fermentativo	43
4.2.3.1	Cepas de leveduras não- <i>Saccharomyces</i> que participam do processo fermentativo realizado pela vinícola Terrassos e na vinificação em microescala ano de 2019.....	47
4.2.3.2	Cepas de leveduras não- <i>Saccharomyces</i> que participam do processo fermentativo-2020	49
4.2.3.3	Análise da relação evolutiva entre as cepas de leveduras não- <i>Saccharomyces</i> que participam dos processos fermentativos	51
4.2.4	Identificação das espécies de leveduras <i>Saccharomyces</i> nativas que participam do processo fermentativo	53

4.2.5 Análise dos resultados	54
4.3 Caracterização tecnológica das espécies de leveduras <i>Saccharomyces</i> nativas isoladas.....	55
4.3.1 Análise de crescimento mosto de uva Syrah.....	56
4.3.2 Análise de crescimento em diferentes concentrações de Metabissulfito de Potássio	58
4.3.3 Seleção das linhagens não produtora de Sulfeto de Hidrogênio	60
4.3.4 Seleção das linhagens resistentes a etanol.....	61
4.3.5 Seleção das linhagens osmotorelantes	62
4.3.6 Seleção das linhagens termotolerantes	65
4.4 Análise dos resultados	66
5 CONCLUSÃO.....	67
6 RELEVÂNCIA DO TRABALHO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	68
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 História do vinho

O vinho é a bebida mais antiga do mundo registrada, contudo, seu surgimento ainda não está elucidado, e cada cultura tem uma visão diferente quanto a este acontecimento. Para os enólogos, a bebida surgiu por acaso, talvez por um punhado de uvas amassadas esquecidas em um recipiente aberto, que sofreram posteriormente os efeitos da fermentação [1; 2].

No entanto, desde os primeiros relatos essa bebida tem atuado como uma importante parte da economia em todo o mundo [3], fazendo da prática da vinificação a mais diversificada. No século XIX as descobertas realizadas por Louis Pasteur e publicada na sua obra “Études sur le vin” em 1866, demonstrou que os vinhos são produto de uma fermentação alcoólica dos açúcares presentes no suco de uva sendo conduzido pelas leveduras, resultando na formação de etanol e dióxido de carbono. Em suas descobertas ele relatou também que as leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* eram o principal organismo responsável por esse processo [4]. Essas descobertas tornou possível traçar novas estratégias, aperfeiçoando o processo de vinificação. Fazendo com que os produtores buscassem as mais diversificadas alternativas para produzir um vinho de qualidade, como o isolamento e comercialização de cepas de leveduras especializadas na produção de vinhos [5].

Atualmente devido as exigências dos consumidores, tem ocorrido uma avaliação mais acentuada das propriedades sensoriais do vinho, impactando essa economia. Ocasionalmente na busca por cepas de leveduras que produzam notas frutadas a partir de compostos metabólicos, bem como outras características desejadas, melhorando significativamente as propriedades organolépticas dos vinhos [6].

Toda essa evolução na história do vinho teve sua importância, fazendo com que essa bebida preservasse a cultura primitiva agregando características atualizadas promovidas pela biotecnologia, para obtenção de vinhos com maior complexidade aromática e características agradáveis que possam satisfazer as exigências dos consumidores.

1.2 Vinícola Terrassos

Com uma área de 3 hectares cultivados de uvas destinadas à produção de vinhos, localizada na Serra da Mantiqueira, no município de Amparo-SP, a vinícola Terrassos

surgiu do sonho de produzir vinhos finos, de qualidade reconhecida, em terras paulistas. Em 2002 começou a idealização do projeto, já em 2003 as primeiras vinhas foram plantadas. Posteriormente, em 2010, os primeiros vinhos começaram a serem produzidos na cantina da própria vinícola (comunicação pessoal Fabio Luis do Nascimento, proprietário da empresa Terrassos Restaurante e comercio EIRELE CNPJ 28.382.032/0001-18).

Durante a trajetória de desenvolvimento da vinícola, muitas variedades de uvas foram testadas, mas atualmente a produção conta com as uvas: Syrah, Máximo, Rainha, Moscatel e Sauvignon Blanc.

A vinícola Terrassos busca um manejo da uva o mais próximo possível da agricultura orgânica, o uso de herbicidas é evitado, mas ainda, em algumas situações, são usados fungicidas da agricultura convencional. São realizadas roçagens periódicas do solo e o uso da mesma para a cobertura do solo na fileira da uva.

Os vinhos produzidos pela vinícola Terrassos buscam a mínima intervenção na vinificação, valorizando o potencial e a tipicidade da uva. A vinícola divide a produção entre as safras de verão e de inverno, produzindo vinhos equilibrados, elegantes e que buscam atender os diversos tipos de paladares. Como a vinícola tem o foco na produção de vinhos valorizando o *terroir*, ela procura estar atrelada a ciência em busca de estratégias que propiciem a produção de vinhos inovadores e que preservem o *terroir* da região.

Atualmente a produção está em torno de 20 mil litros por ano produzidos a partir da fermentação inoculada com cepas comerciais. Além disso, a vinícola é uma atração turística local, que recebe visitantes de todo o Brasil e cerca de 80% da produção é vendida na propriedade.

1.3 Produção do vinho

1.3.1 Leveduras e a produção de vinhos

Das vinhas até a garrafa, as uvas são transformadas em vinhos através da atividade metabólica microbiana, as quais determinam os parâmetros de qualidade dos vinhos. Estudos demonstram o importante papel das leveduras, principalmente as da espécie *Saccharomyces cerevisiae* na obtenção de um vinho de qualidade, uma vez que atribuem ao vinho o sabor e as características analíticas e sensoriais específicas [7; 8; 9]. No mercado brasileiro pode-se obter cepas de leveduras selecionadas comercialmente de variedades muito limitadas, adquiridas por fornecedores internacionais já que o Brasil

não dispõe deste recurso. O uso destas leveduras comerciais no processo de vinificação não proporciona ao vinho característica organoléptica próprias, uma vez que essas cepas, por não serem selecionadas em ambientes brasileiro, não possuem as vias metabólicas adaptadas necessárias para aumentar a tipicidade dos vinhos locais. Tendo em vista que vinhas em diferentes regiões apresentam características individuais.

Diferentes tipos de leveduras podem ser encontradas nos frutos, nas folhas, no solo e nas cubas de fermentação, sendo que estas leveduras são transportadas da vinha até as cubas durante a colheita [10]. No início do processo fermentativo estes microrganismos encontram-se misturados e o desenvolvimento de cada um é determinado pelo grau de resistência aos anidridos sulfurosos e à concentração de etanol [11; 12].

A adição de metabissulfito no mosto no início da fermentação tem como objetivo inibir o desenvolvimento dos microrganismos indesejáveis. No entanto, muitos destes microrganismos apresentam maior resistência a esse composto e permanecem no processo durante algum tempo [11]. A partir do momento que ocorre a inoculação do mosto com leveduras selecionadas, essas leveduras predominam no processo elevando assim a concentração de etanol momento o qual muitas dessas leveduras nativas são eliminadas.

Algumas dessas leveduras nativas podem apresentar características fisiológicas necessárias para permanecerem até o final do processo fermentativo competindo com as leveduras inoculadas (cepas comerciais) [13]. No entanto, toda essa dinâmica de espécie tem sua participação no processo, sendo nos primeiros momentos ou até mesmo nas últimas etapas do processo fermentativo, contribuindo com compostos metabólicos negativos ou cruciais para a qualidade do produto final [7; 9; 14; 15]. Determinar a população de leveduras que colonizam o ambiente vitivinícola e compreender a dinâmica de sucessão que ocorre durante o processo fermentativo é de grande importância, pois através desta análise pode-se determinar as características genéticas e bioquímica de cada cepa presente e suas contribuições para o produto final [12; 16; 17].

Para que o processo de produção do vinho brasileiro tenha características únicas, é importante selecionar cepas de leveduras iniciadoras do processo fermentativo adaptadas as condições ambientais da região produtora. O uso dessas cepas resultará em um vinho com propriedades únicas que preserve sua identidade histórica, qualidade e procedência geográfica [18].

1.3.2 Sulfitação do mosto

Dióxido de enxofre (SO₂) é caracterizado por inibir o crescimento microbiano, sendo capaz de interferir nos processos intracelulares. O SO₂ é uma molécula altamente reativa que se liga a diversos metabólitos e enzimas na célula, fazendo com que as rotas de biossíntese sejam desviadas, e impedindo as substâncias dihidroxiacetona-fosfato, piruvato, acetaldeído, ácido oxalacético e ácido alfa-cetoglutárico, de serem utilizadas como fonte de energia [19; 20]. Leveduras *Saccharomyces cerevisiae* apresentam uma tolerância a este composto no limiar de concentração de 100 mg/L. No processo de fermentação de vinhos o SO₂ é muito utilizado pelo fato de essa concentração controlar o crescimento de leveduras selvagens e de bactérias acéticas [11].

O SO₂ pode ser adicionado direta ou indiretamente por meio de sais como sulfito de sódio, bissulfito de sódio, bissulfito de potássio, metabissulfito de sódio e metabissulfito de potássio [21].

1.4 Microbiota vitivinícola e o isolamento de leveduras nativas

O microbioma vitivinícola se caracteriza pela grande variedade de microrganismos que o compõe, como exemplos fungos filamentosos, bactérias e leveduras [10; 22; 23]. As leveduras representam uma grande parte dos microrganismos que colonizam o ambiente vitivinícola. Dentro dessa classe de microrganismo, encontramos leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, que colonizam o solo, a superfície das videiras e frutos e são transportados durante a colheita até as cubas de fermentação. Durante o processo fermentativo cada espécie contribui significativamente para a qualidade desse processo [24], uma vez que além de converter açúcares em CO₂ e etanol, elas também são capazes de produzir subprodutos oriundos da sua atividade metabólica que definem as propriedades organolépticas do vinho [7].

Como vimos anteriormente as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* tem sido historicamente a mais utilizada no processo de vinificação devido suas características fisiológicas específicas. Contudo, espécies de leveduras não-*Saccharomyces* são frequentemente isoladas durante a fermentação alcoólica, essas leveduras podem ser de interesse biotecnológico, uma vez que estudos demonstram que as leveduras não-*Saccharomyces* participam ativamente do processo fermentativo e são responsáveis pela produção de metabólitos que interferem diretamente na qualidade do vinho [13; 25].

Nos últimos anos, a indústria enológica passou por importantes transformações, tornando-se um setor em constantes mudanças e inovações resultando na produção de

vinhos inovadores e diferenciados. Uma das estratégias que está sendo muito utilizada entre os vitivinicultores ao redor do mundo é a utilização de culturas de leveduras nativas para a produção de vinhos com características enológicas e sensoriais particulares [26; 27; 28; 29; 30; 31].

1.5 Taxonomia das leveduras

As leveduras são fungos unicelulares eucariotos que pertencem a duas classes (i) ascomicetos ou (ii) basidiomicetos, cujo crescimento resulta principalmente de brotamento ou fissão binária [32]. Elas podem ser caracterizadas por estados sexuais que não são formados dentro ou sobre um corpo de frutificação [26]. Dentro desse grupo estão mais de 149 gêneros e 1500 espécies de leveduras [32]. A classificação das leveduras dentro dos seus respectivos grupos é baseada nas similaridades ou relações ancestrais comuns, onde são levados em consideração aspectos como formato da célula, sexualidade ou perda de fase sexual [18; 32; 33] e critérios morfológicos e fisiológicos como, recursos nutricionais. Com o advento da evolução científica foram desenvolvidas técnicas mais rápidas e eficazes para identificação das leveduras de acordo com seu respectivo gênero. Dentre essas técnicas estão incluídos os recursos bioquímicos [34] e moleculares [35]. Uma técnica molecular por PCR que vem sendo utilizada frequentemente nas pesquisas que envolvem análise de leveduras a nível de gênero são as variações que ocorrem no DNA ribossomal. Genes do DNA ribossomal estão contidos em todos os microrganismos e ele é conhecido por acumular mutações lentas, tornando possível identificar variabilidade intraespecífica (cepas de espécies diferentes) e interespecífica (cepas da mesma espécie) [35; 36].

As espécies de leveduras podem ser divididas em vários grupos de acordo com sua importância tecnológica, e também quanto a sua patogenicidade.

A espécie mais comum dentro desse grupo de microrganismo é *Saccharomyces cerevisiae* a qual desempenha grande importância tecnológica devido a sua grande capacidade fermentativa atuando principalmente na produção de alimentos e bebidas.

1.6 Leveduras selvagens

O ambiente vitivinícola abriga diferentes espécies de leveduras e essa abundância juntamente com os fatores climáticos e geográficos refletem diretamente no *terroir* do vinho produzido [10; 14]. Considera-se como leveduras selvagens aquelas leveduras que colonizam naturalmente o solo, a superfície de folhas e frutos ou qualquer outro ambiente.

Essas cepas de leveduras selvagens podem ser uma alternativa as leveduras comerciais, por serem nativas da região. Podendo ser melhores adaptadas as condições daquele ambiente e conseqüentemente do mosto, assumindo um papel essencial no processo fermentativo. Por serem adaptadas, essas cepas também poderão contribuir através da produção de compostos metabólicos que atribuirão ao vinho um perfil aromático diversificado, conferindo um caráter regional no vinho produzido [37; 38; 39; 40].

1.7 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é a principal levedura utilizada em biotecnologia em todo o mundo, devido à suas características fisiológicas associada à papéis-chave nas fermentações de alimentos e outros processos indústrias. Além de sua aplicação tradicional nos processos fermentativos, ela também tem sido usada como o principal modelo de organismo eucariótico em pesquisas, devido às suas propriedades fisiológicas desejáveis e o que facilita os métodos de manipulação genética [4].

Quanto sua atividade nos processos fermentativos, em particular, na produção de vinho, *Saccharomyces cerevisiae* tem sido usada há séculos devido às suas características específicas como: alta capacidade fermentativa, cinética de fermentação adequada, baixa produção de ácido acético, caráter de resistente a altas concentrações de açúcar, etanol e dióxido de enxofre e também, a elevada produção de compostos aromáticos agradáveis [41; 42]. Em 1890, foram produzidos os primeiros vinhos utilizando culturas de *Saccharomyces cerevisiae* para atuarem como *starters* no processo fermentativo, e conseqüentemente as primeiras cepas comerciais foram introduzidas no mercado [41]. Desde então, diferentes abordagens têm sido utilizadas para potencializar a produção de vinhos, como fermentações inoculadas com uma cepa em específico ou em conjunto (mix de leveduras) para otimizar a produção do vinho e elevar suas características organolépticas [25].

1.8 *Saccharomyces cerevisiae* comerciais

Após as contribuições realizadas por Louis Pasteur, um novo olhar foi lançado ao processo fermentativo, destacando a importância das leveduras neste processo. Com esse conhecimento, o homem utilizou estratégias para seleção de cepas visando melhor desempenho durante o processo fermentativo. Conseqüentemente, utilizando essas cepas como inóculo inicial do processo resultando em uma fermentação mais rápida e previsível [40].

Essas cepas de leveduras comerciais são cepas isoladas da natureza que quando apresentaram desempenho satisfatório foram cultivadas e liofilizadas, isto é, passaram por um processo de desidratação conferindo vida mais longa as cepas. E assim então sendo ofertadas aos produtores de vinhos que visam maior estabilidade do processo fermentativo. No entanto essas cepas não oferecem uma diversificação nos vinhos produzidos por não serem adaptadas as uvas cultivadas naquela região [37; 39; 40].

Este cenário vai a contra mão dos objetivos dos vitivicultores atuais que buscam cada vez mais a produção de vinhos diversificados.

As cepas de leveduras comerciais utilizadas na vinícola em que o presente trabalho foi realizado são:

AWRI 796: é uma cepa isolada na África do Sul, esta cepa é caracterizada por alto teor de glicerol e baixo produção de etanol por grama de açúcar utilizado. Ela também se destaca devido sua tolerância a etanol que fica na faixa de 14.5-15.5% (v/v), geralmente apresenta uma produção de acidez volátil em torno de 0,3 g/l e apresenta floculação excelente. É uma cepa de levedura que produz baixos níveis de aroma e compostos de sabor e é considerada como fermento neutro, indicada para produção de vinhos tintos com grandes benefícios em mosto de uva syrah [43].

BP-725: está cepa é de origem Francesa, é caracterizada pela sua elevada tolerância a etanol que se alcança o limiar de 16% (v/v), e produção de acidez volátil geralmente inferior a 0,3 g/l, outra característica que faz dessa cepa uma das mais utilizadas é a sua ótima capacidade de flocular. Essa cepa se diferencia pela capacidade de realçar o sabor varietal dos vinhos tintos contribuindo através de compostos que aumentam a cor e aroma do vinho [43].

PDM: É uma cepa indicada para fermentações em baixas temperaturas, apresenta elevada tolerância a etanol que se alcança o limiar de 15-17% (v/v), e produção de acidez volátil geralmente inferior a 0,3 g/l e apresenta excelente capacidade de floculação. É uma cepa de levedura indicada para fins gerais na produção de vinhos tintos e brancos, produz níveis baixos a moderado de compostos aromáticos e de sabor de vinho. É indicada quando se quer uma contribuição mais sutil de levedura [43].

1.9 Características fisiológicas das leveduras não-*Saccharomyces*

Non-Saccharomyces é um termo utilizado para diferenciar leveduras que pertencem a um grupo de espécies com menor desempenho fermentativo. Dentro desse

grupo encontramos algumas espécies denominadas como deterioradoras e outras que possuem características fisiológicas que enriquecem o perfil aromático do vinho [12; 25].

No entanto, as não-*Saccharomyces* apresentam baixo desempenho fermentativo o que limita sua atuação até os estágios finais do processo fermentativo. Por esse motivo, são indicadas para serem utilizadas em conjunto formando um mix de leveduras para fornecer maior diversidade ao vinho produzido e melhorar o perfil sensorial [7; 14; 25]. Essas espécies também podem ser utilizadas como alternativa para reduzir o teor alcóolico nos vinhos, tema de grande desafio para os enólogos que buscam metodologias alternativas para agradarem os consumidores que buscam por vinhos que apresentam baixo teor alcóolico [44; 45; 46; 47]. Principalmente em cultivares localizados em clima quente como o Brasil, onde as condições climáticas favorecem o amadurecimento excessivo das uvas elevando os níveis de açúcares e conseqüentemente elevando também o teor alcóolico [25; 45; 48]. As contribuições das leveduras não-*Saccharomyces* ao vinho pode ocorrer por diversos mecanismos. Além de reduzir o teor alcóolico, outra característica que destaca nesse grupo leveduras é capacidade de produzir uma ampla gama de compostos voláteis que aumentam o perfil aromático e também nivelar as concentrações de dióxido de enxofre (SO₂) no vinho [15; 25; 27; 48; 49].

Desde as descobertas realizadas por Louis Pasteur, as leveduras *Saccharomyces* tem sido considerada a principal levedura utilizada para a produção de vinhos [50]. No entanto, estudos posteriores mostraram que leveduras não-*Saccharomyces* nativas presente no mosto adentram o processo fermentativo, e, muitas vezes, em maior número que as *Saccharomyces* [51].

Em busca de uma melhor compreensão do processo fermentativo tem-se realizado uma investigação mais acentuada sobre as características dessas espécies como também suas contribuições para o produto final. Estudos tem demonstrado que, cepas de leveduras não-*Saccharomyces* são responsáveis pela produção de vinhos com altos valores sensoriais.

1.10 Metabolismo das leveduras e a produção de compostos

A glicólise é a via central do catabolismo da glicose para obtenção de energia, não apenas em animais e vegetais, mas também na maioria dos microrganismos. A sequência de reações da glicólise difere de uma espécie para outra apenas na forma em que sua velocidade é regulada e no destino metabólico do piruvato formado [81]. A Figura 1 ilustra a obtenção de energia através da via glicolítica pelas leveduras.

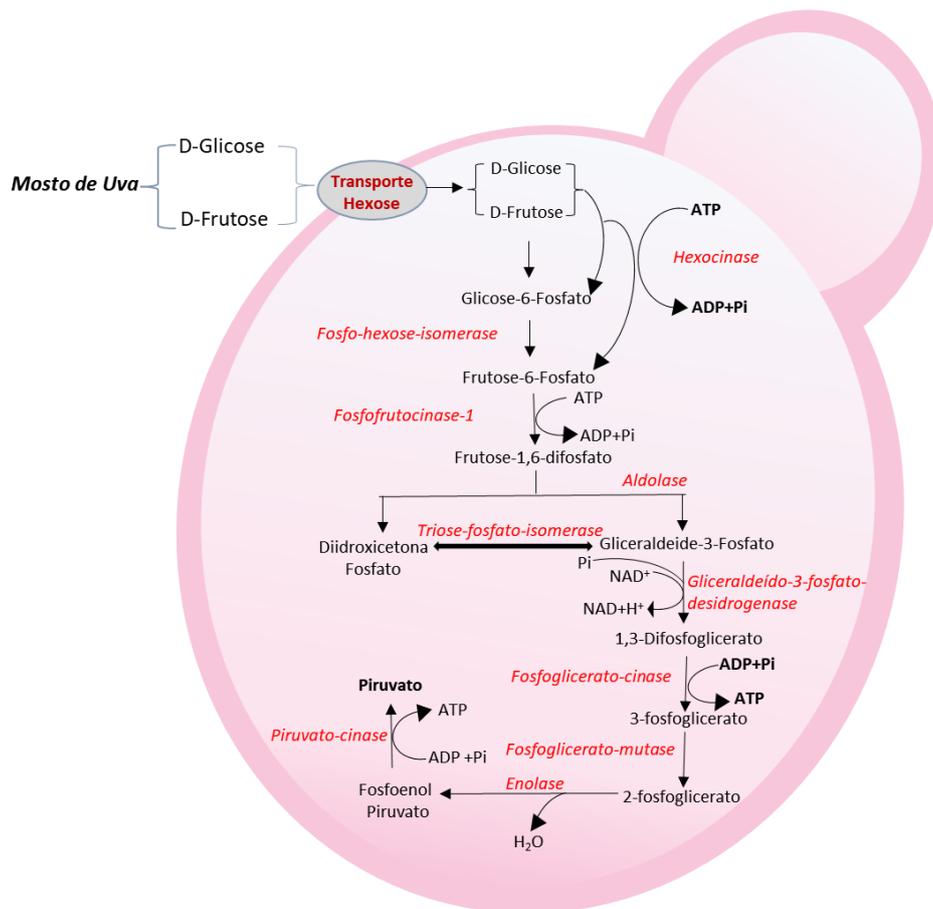


Figura-1 Metabolismo de carboidratos para obtenção de energia realizado pelas leveduras. Imagem adaptada de ZAMORA (2009) [82].

Em diversos organismos, o piruvato formado durante a via glicolítica pode seguir por três vias importantes. Nos organismos aeróbios a glicólise é apenas o primeiro estágio da degradação aeróbica completa da glicose a CO_2 e H_2O . A segunda via possível ao piruvato é a sua redução a lactato e a terceira via é a formação de etanol [81]. Em alguns microrganismos, como as leveduras, o piruvato formado a partir da glicose pela via glicolítica é convertido anaerobicamente em etanol e CO_2 , um processo chamado fermentação alcoólica [81].

Durante a fermentação alcoólica de uvas, além de CO_2 e etanol podem ser produzidos compostos que interferem diretamente na produção de vinho. Esses compostos podem ser produzidos por um desvio da rota metabólica, pelas propriedades do mosto, pelas condições da fermentação ou até mesmo pela espécie de levedura utilizada no processo [7; 83]

O surgimento do aroma no vinho é devido a compostos químicos com pontos de ebulição baixos, que são, portanto, voláteis e são detectáveis pelo nariz humano. Pequenas diferenças na concentração desses compostos voláteis podem interferir na complexidade aromática do vinho [16]. O aroma e o sabor do vinho são as principais características que

definem as diferenças dos vinhos entre uma ampla gama de vinhos produzidos, e eles podem ser afetados por inúmeras variações que podem ocorrer durante o processo de produção do vinho [84]. Os compostos que mais interferem na qualidade do vinho são álcoois superiores, ácido acético, ésteres e compostos sulfurados [80; 85; 86; 87; 88]. A figura 2 representa algumas vias responsáveis pela produção desses compostos.

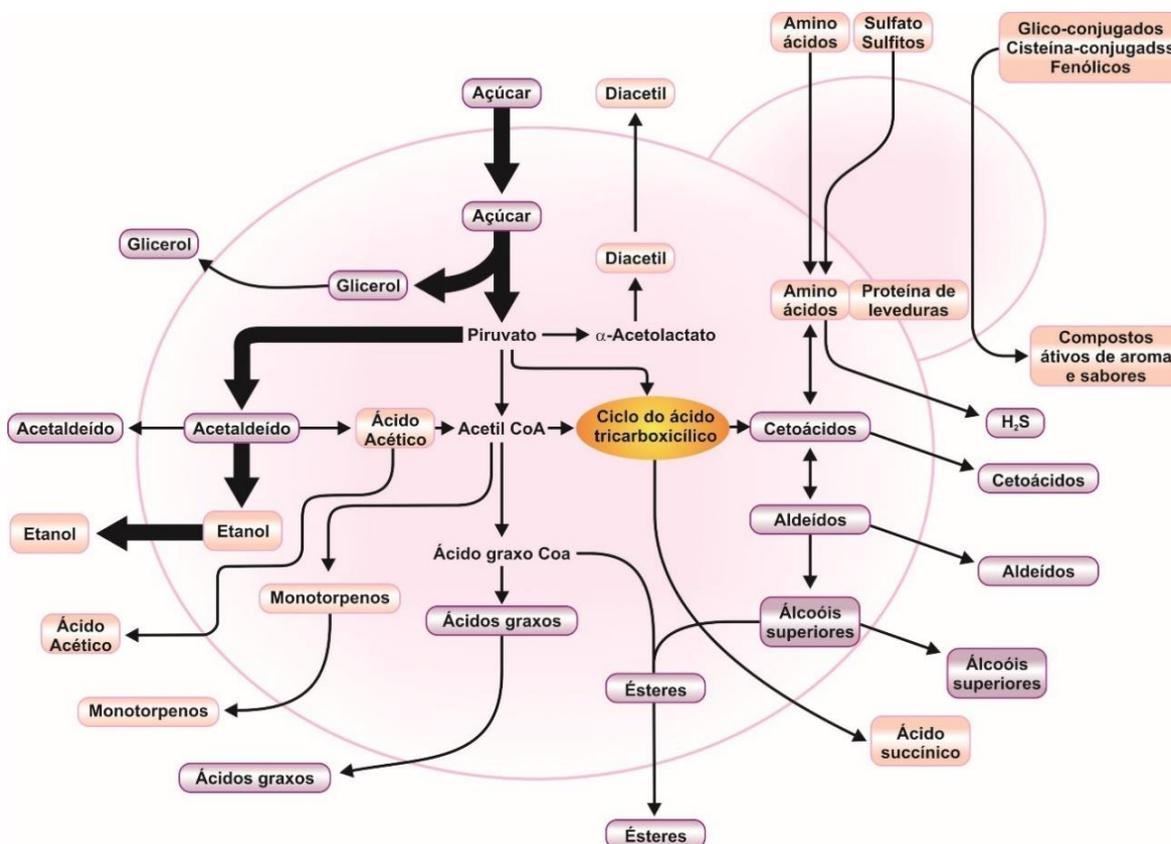


Figura-2 Representação da síntese de compostos aromáticos a partir do metabolismo de açúcares, aminoácidos e enxofre em leveduras. Imagem adaptada de SWIEGERS et al. [17].

1.10.1 Álcoois superiores

Durante a fermentação do mosto ocorre a formação de álcoois superiores através do metabolismo das leveduras, os álcoois superiores podem ser divididos em alifáticos e aromáticos. Os níveis de concentrações desses compostos no produto final são determinados por alguns fatores como: temperatura, pH do mosto, concentração de etanol e aminoácidos produzidos durante o metabolismo celular [51; 89]. Esses compostos metabólicos representam grande importancia para produção de vinhos podendo impactar positivamente ou negativamente [50; 84; 90]. Embora os álcoois superiores em altas concentrações conferem sabores desagradáveis, quando em equilibradas concentrações esses compostos contribuem de maneira essencial para a qualidade dos sabores e aromas

do vinho [7; 91]. O equilíbrio desses compostos no vinho produzido propicia uma diversidade organoléptica aumentando sua tipicidade.

Os principais álcoois alifáticos incluem propanol, álcool isoamílico, isobutanol e álcool amílico ativo. Já os principais álcoois aromáticos consistem em álcool 2-feniletílico e tirosol. As concentrações totais mais altas de álcool variam de 140 a 420 mg/L [91], onde concentrações abaixo de 300 mg/L adicionam um nível desejável de complexidade ao vinho, enquanto concentrações que excedem esse nível podem ter um efeito prejudicial [92]. Quantitativamente, os principais álcoois superiores no vinho são isobutanol (9,2 mg/L), feniletanol (6,1 mg/L) e álcool isoamílico (1,41 mg/L) [87].

1.10.2 Ácido acético

O ácido acético normalmente constitui 90% dos ácidos voláteis, e são resultantes do metabolismo dos ácidos graxos em leveduras e bactérias [88].

É normal que todo vinho apresente acidez volátil porque o ácido acético é um produto secundário normal da fermentação alcoólica. Porém quando em elevadas concentrações, confere um caráter semelhante ao do vinagre, dependendo do estilo do vinho a concentração ótima é de 0,2 - 0,7 g/L.

A quantidade de ácido acético produzida numa fermentação de mosto saudável é sempre pequena, de 0,18 g/L-1 a 0,36 g/L [51]. Seus níveis no produto final dependem muito da espécie de levedura, da composição do mosto (acidez do fruto, teor de açúcares e substâncias nitrogenadas) e das condições de fermentação (temperatura e aeração) [88].

O limite aceitável de ácido acético é de 1,2 g/L, de acordo com a legislação europeia (OIV 2009), mas em concentrações acima de 0,8 g/L, o ácido acético já pode conferir ao vinho um sabor ácido prejudicial [93].

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* produzem ácido acético na faixa de 0,3-1,2 g/L [51], no entanto, sua produção é influenciada pelo pH, açúcar e concentração de nitrogênio [88].

1.10.3 Ésteres

Os ésteres são um grupo de compostos voláteis, embora alguns contribuam negativamente para a qualidade do vinho, em sua maioria esses compostos conferem aromas frutados e florais aos vinhos. A síntese dos ésteres durante a fermentação depende das concentrações de acil-CoA e etanol, e também da atividade das enzimas envolvidas na síntese aciltransferases e esterases [94]. Durante a fermentação do vinho, a

concentração máxima de ésteres é obtida quando as leveduras atingem a fase estacionária de crescimento [95].

Existem duas principais classes de ésteres produzidos durante a fermentação do mosto, os ésteres etílicos que são derivados dos ácidos graxos e os ésteres acetato que derivam dos álcoois superiores.

Ésteres de etila são formados entre etanol e ácidos graxos ou a partir de ácidos orgânicos não voláteis, eles contribuem para o aroma do vinho com odores pouco proeminentes que lembram cera de vela ou sabão. Já os ésteres acetato, derivam da junção de um álcool com um ácido, os mais significativos para o vinho são, acetato de isobutila (aroma frutado), acetato de isoamila (banana) e acetato de 2-feniletila (aroma floral) [86; 96].

1.10.4 Compostos sulfurados

Entre os metabólitos voláteis produzidos pelas leveduras que interferem no aroma do vinho, os compostos contendo enxofre são os de maiores importância, motivo pelo qual que, esses compostos influenciam nas propriedades organolépticas do vinho [97]. Os compostos de enxofre têm uma diversidade considerável e são classificados em cinco categorias: sulfetos, polisulfetos, compostos heterocíclicos, tioésteres e tióis. Eles podem apresentar diferentes propriedades sensoriais dependendo da posição do átomo de enxofre na molécula e de suas concentrações [50].

Os compostos de enxofre possuem aroma e sabores estranhos e fortes, muitas vezes referidos como redutores, identificados como odores de ovo podre, alho, cebola e repolho [98], Entre os compostos de enxofre mais importantes com impacto negativo na qualidade sensorial do vinho estão: o sulfureto de hidrogênio, o metanotiol e o sulfureto de dimetilo [99]. Embora a maioria desses compostos de enxofre contribuam negativamente para a qualidade do vinho, alguns deles têm um efeito positivo nas propriedades aromáticas conferindo amores semelhantes à morango e laranja [100].

1.10.5 Sulfeto de hidrogênio H₂S

A presença de H₂S no vinho é um problema importante para produtores de vinhos, seu limite de odor perceptível é de 0,9-1,1 µg/L para os vinhos brancos e 1,6 µg/L para os vinhos tinto. Mas mesmo em um nível não percebido ao nariz humano o H₂S pode impactar negativamente o aroma do vinho [101]. Como resultado de sua alta reatividade, o H₂S pode participar de diversas reações se tornando precursores de compostos como,

sulfeto de dimetil, sulfeto de dietil e dissulfeto de dimetil, que também podem afetar a qualidade do vinho atribuindo ao vinho aroma de ovo e vegetais podres, [102; 103].

Existem vários fatores que estão relacionados ao surgimento de H_2S durante a produção de vinhos, como, altos níveis residuais de enxofre elementar, presença de dióxido de enxofre e a presença de compostos orgânicos de enxofre [104]. A maioria do H_2S produzido pelas leveduras durante o processo fermentativo é originado pela via de assimilação do sulfato. O mosto apresenta elevadas concentrações de sulfato entre 160 a 700 mg/L esse sulfato então é reduzido a sulfeto e conseqüentemente o sulfeto serve como precursor dos aminoácidos cisteína, metionina e glutatona que se tornam precursores para produção de H_2S . A figura 3 representa a produção de H_2S durante os processos celulares [85; 105; 106; 107].

Outro fator que aumenta a produção de H_2S , é a concentração de nitrogênio disponível durante o processo fermentativo, tanto a limitação quanto o excesso de nitrogênio afetam significativamente a produção de H_2S [108]. Portanto os níveis de nitrogênio durante o processo fermentativo devem estar em equilíbrio [103; 108; 109]. O limiar de concentração de H_2S detectável em vinhos é inferior a 1 $\mu\text{g/L}$ [88; 92; 101].

As leveduras são as principais responsáveis pelo H_2S originado durante o processo fermentativo, e a base genética que uma levedura apresenta é uma variável importante na produção de H_2S . O H_2S pode ser produzido nos primeiros estágios do processo fermentativo onde a produção de biomassas está em alta, mas também nos últimos estágios. A produção tardia de H_2S pode ser justificada pela renovação dos componentes intracelulares contendo enxofre ou por respostas aos estresses do meio [110].

As leveduras podem responder de diferentes formas aos fatores fisiológicos e ambientais na produção de H_2S . O que torna essencial conhecer o potencial que uma levedura apresente quanto a produção de H_2S [104; 110].

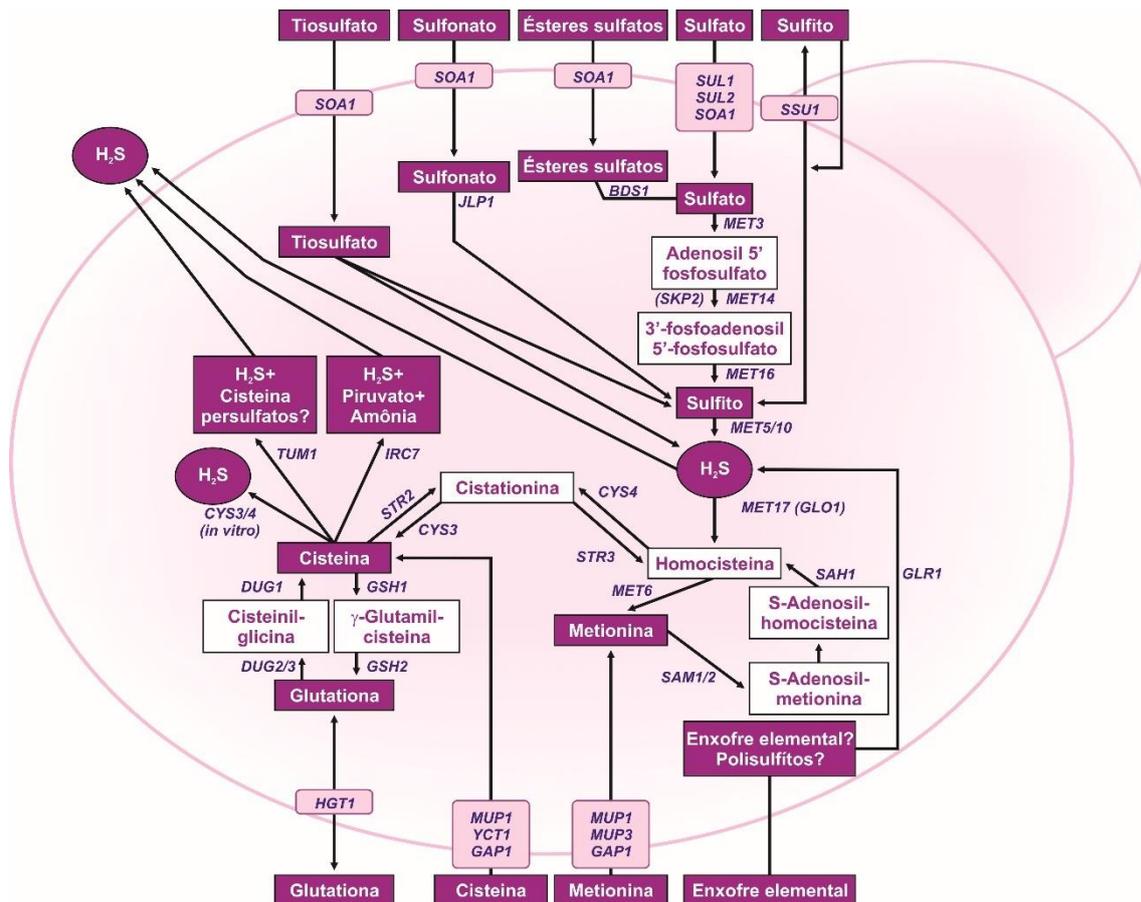


Figura-3 Representação esquemática das vias relacionadas com a produção de sulfeto de hidrogênio H₂S, durante o metabolismo de leveduras. Imagem adaptada de Huang, 2017 [107].

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Isolar linhagens de leveduras do ambiente vitivinícola e também do processo fermentativo com o intuito de avaliar a microbiota de leveduras presente na região vitivinícola. Selecionar e caracterizar do ponto de vista genético e fermentativo, leveduras nativas da região produtora de vinho as quais irão atuar como *starters* no processo de fermentação.

2.2 Objetivo específicos

- I- Avaliar o ambiente vitivinícola e o processo fermentativo, visando o isolamento e identificação de cepas de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* nativas da região produtora de vinhos.

- II- Avaliar a diversidade de leveduras não-*Saccharomyces* que colonizam o ambiente vitivinícola.
- III- Avaliar a diversidade de leveduras *Saccharomyces* que colonizam o ambiente vitivinícola.
- IV- Selecionar as linhagens de leveduras *Saccharomyces* nativas e distintas das aplicadas industrialmente
- V- Avaliar características de resistência e tolerância a diferentes estresses inerentes ao processo fermentativo

3 MÉTODOS

3.1 Isolamento de leveduras do ambiente de produção do vinho

As amostras foram coletadas em pontos estratégicos do ambiente vitivinícola de acordo com as coordenadas geográficas descritas nas tabelas 1 e 2. Todas as amostras foram coletadas e transportadas ao laboratório de maneira estéril a fim de preservar a microbiota do local de coleta, as amostras foram colocadas em tubos cônicos de 15 ml contendo 5 ml de meio YPD 2%, o mosto foi transferido para um recipiente logo após o desengace das uvas.

No laboratório, 200 µl de todas as amostras, inclusive do mosto, foi transferido para tubos cônicos contendo 5 ml de meio YPD 2% e incubadas sob agitação de 180 G a temperatura de 30°C *overnight* para crescimento. No dia seguinte foi semeado em placas de Petri com meio YPD 2% acrescido com ampicilina 10 µg/ml, 50 µl de cada amostra, sendo posteriormente incubadas a temperatura de 30°C para crescimento por 24 horas. Após o período de incubação, as colônias de leveduras que apresentaram crescimento foram isoladas e transferidas para novas placas também contendo meio YPD 2% e novamente incubadas à 30°C por 24 horas para crescimento. Todas as colônias isoladas foram crescidas também em meio líquido YPD 2% e armazenadas após a adição de glicerol 30% em freezer -80°C.

3.2 Análise da composição e sucessão de leveduras ao longo do processo fermentativo na vinícola.

Durante o processo fermentativo podemos encontrar uma grande diversidade de microrganismos em particular as leveduras. Essas espécies de leveduras podem atuar como grandes protagonistas sintetizando componentes chave para a obtenção de um

vinho de qualidade como também, podem produzir compostos que afetam intrinsecamente a qualidade do vinho.

A fim de testar a hipótese descrita realizamos os seguintes procedimentos:

Monitoramos o processo de fermentação na vinícola e adicionalmente realizamos uma vinificação em microescala, simulando a fermentação de vinhos.

A microvinificação foi realizada em erlenmeyer contendo 500 ml do mesmo mosto que estava sendo utilizado pela vinícola, e o inoculamos com a mesma levedura comercial que estava sendo usada como *starter* do processo, onde ajustamos a concentração inicial de células de $2 \cdot 10^6$ L. Os erlenmeyer foram vedados com mangueiras instaladas para respiro, o processo de microvinificação foi realizado de forma sincronizada durante todas etapas do processo que estava sendo realizado na vinícola e também interrompido ao mesmo tempo.

Ambos os processos foram analisados com os mesmos parâmetros que estão descritos a seguir:

Coletamos de amostras de ambos processos nos seguintes pontos:

1. Mosto sem adição de metabissulfito
2. Mosto e vinte e quatro horas após a adição de metabissulfito (antes do inóculo da cepa comercial).
3. Doze horas após inóculo (primeiro dia da fermentação tempo1).
4. Quinto dia da fermentação (tempo 2).
5. Nono dia da fermentação (tempo3).
6. Décimo quarto dia da fermentação (tempo 4).

Todas as amostras foram levadas ao laboratório as quais passaram por análises para determinar as leveduras que predominam cada estágio da fermentação através do *screening* inicial YCB/Lisina e posteriormente realizamos a análise molecular através da amplificação da região ITS e genotipagem descritos nos itens 3.4 e 3.5. O consumo dos açúcares totais do mosto ao longo do processo foi quantificado utilizando o método do ácido-3,5-dinitro salicílico (DNS) que está descrito no item 3.3.

3.3 Análise do consumo de açúcares totais pela técnica do ácido-dinitrosalicílico:

Coletamos amostras dos diferentes estágios do processo fermentativo com intuito de realizar uma quantificação dos açúcares totais ao longo do processo fermentativo.

A quantificação foi realizada pelo método do ácido-3,5-dinitrosalicilato, uma vez que este composto é capaz de sofrer redução a partir da reação com açúcares que

apresentam extremidades redutoras, formando o ácido-3-amino-5-nitrosalicílico, cuja coloração pode ser detectada em 540nm por espectrofotometria. Sob este ponto de vista, é possível, assim, conduzir estudos qualitativos para monossacarídeos e, em menor grau, dissacarídeos em vista da presença de extremidades redutoras livres nestas moléculas [111].

3.4 Identificação leveduras do gênero *Saccharomyces*

A capacidade das cepas de assimilar diferentes fontes de nitrogênio foi analisada utilizando o método de cultivo em placas com meio YCB (*Yeast Carbon Base*) utilizando como única fonte de Nitrogênio o aminoácido L-Lisina. Leveduras do gênero *Saccharomyces* apresentam pouco ou nenhum crescimento sob estas condições, em contra partida leveduras não-*Saccharomyces* são capazes de crescerem rapidamente tendo como única fonte de nitrogênio este aminoácido. Uma linhagem de *Candida albicans* foi utilizada como controle não-*Saccharomyces*.

Com esse experimento realizamos um *screening* inicial para distinguir dentre as isoladas, as leveduras *Saccharomyces* e não- *Saccharomyces*. 5ul de cada inóculo de levedura foi cultivado em concentrações iguais após a realização de diluições seriadas de 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , através da técnica de *droup-out* em placas YEPD 2% (20 g/l peptona, 10 g/L extrato de levedura e 20 g/L de dextrose para cada 1 litro de água esterilizada) e placas YCB com Lisina como única fonte de nitrogênio (YCB-Lis) (11,7% de meio de cultura YCB Difco e 1% de Lisina). As placas foram incubadas à temperatura de 30°C por 48 horas e o crescimento entre os diferentes meios foram comparados. Foram consideradas não-*Saccharomyces*, leveduras que tiveram crescimento semelhante em ambos os meios de cultura e as com crescimento reduzido ou nulo no meio YCB-Lisina foram consideradas possíveis *Saccharomyces*.

Preparo das placas: Preparamos uma solução contendo: 11,7 g Yeast Carbono Base (YCB), 1 g Lisina, 100 ml de água autoclavada, os componentes foram misturados até total homogeneização, logo após filtrados em filtro de 20nm em ambiente estéril. Posteriormente fizemos outra solução ágar e água (450 ml de água e 10 g de ágar) que foram autoclavados. Para finalizar, juntamos (50 ml da solução YCB/Lisina, 450 ml da solução água e ágar) e adicionamos em placas de Petri.

3.5 Identificação molecular e caracterização das linhagens

3.5.1 Extração do DNA:

A extração do DNA foi realizada seguindo a técnica de fenol clorofórmico, descrita por Hoffman [112]. Resumidamente, um pré-inóculo de cada cultura foi centrifugado por 5 minutos à 4000 G e seu precipitado ressuspensão em 500 µl de tampão Tris-HCL-SDS. Após a homogeneização desta solução, foi adicionado 5 perlas de vidro e agitadas vigorosamente por 10 minutos. 200 µl desta solução foram transferidos para um novo tubo e agitados vigorosamente após a adição de 100 µl de fenol e 100 µl de clorofórmio. Após um processo de centrifugação a velocidade máxima, a fase superior (aquosa) foi transferida para um novo tubo, no qual o DNA foi precipitado por adição de 300 µl de isopropanol e centrifugação a velocidade máxima por 5 minutos. Em seguida, o precipitado foi lavado com 300 µl de etanol 70%, com nova centrifugação por 1 minuto. O precipitado foi deixado a temperatura ambiente para evaporar o etanol e ressuspensão em 80 µl de água estéril. As amostras podem ficar estocadas em -20°C até o momento do uso se preciso.

3.5.2 Amplificação da região ITS:

A identificação de gênero foi realizada em todas as leveduras isoladas, onde utilizamos oligonucleotídeos iniciadores responsáveis por amplificar uma região não codificante entre os genes que codificam para o RNA ribossômico de eucariotos ITS-1 (*Internal Transcribed Spacer*). Essa região tem sido utilizada como uma ótima alternativa para diferenciação intragênica de leveduras [35]. Os iniciadores para esta amplificação estão descritos abaixo:

ITS1-F 5'ACGGTGAGAGATTCTGTGC3'

ITS1-R 5'AGCTGGCAGTATTCCCACAG3'

As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 55,5 °C por 2 min e extensão a 72 °C por 2 min e 72 °C por 10 min para finalizar a extensão.

Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e onde comparamos os padrões de amplificação que se formaram. Utilizamos como controle *Candida albicans* como não-*Saccharomyces* e como controle *Saccharomyces* cepas comerciais usadas comumente pela vinícola.

3.5.3 Análises de genotipagem

As leveduras caracterizadas da espécie *Saccharomyces cerevisiae* através da amplificação da região ITS foram submetidas a teste de genotipagem. Técnica a qual utilizamos oligonucleotídios iniciadores que flanqueiam regiões polimórficas de *Saccharomyces cerevisiae* baseado na metodologia descrita por Carvalho-Neto e colaboradores.

Essa técnica foi utilizada para identificação das linhagens e compara-las as leveduras atualmente utilizadas no processo da produção de vinho na vinícola em questão. Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% onde comparamos os padrões de amplicons formados.

Foram utilizados 4 oligonucleotídios iniciadores para as reações (3 µl de cada iniciador, 7 µl de master mix e 1 µl de DNA).

Os genes utilizados para as análises e os respectivos iniciadores estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Genes e seus respectivos iniciadores utilizados na técnica de genotipagem.

ORF	GENES	SEQUÊNCIAS DE INICIADORES	TEMPERATURA DE MELTING (°C)
YLL021W	SPA2c	GAAAATGACGATGCAGACGA AGGACTCGCTTCCCTTACC	55
YKL201C	MNN4c	TAGACCTTTTGGCCTCAACT ATTACCACGATTCCGTCGAA	57
YKL163W	PIR3c	TGTCGCCTCATCTAAAGCAA TGTAATTTGGGATGCAGCAG	55
YFL024C	EPL1	ACGATTCCAAATACGACGAA TTCTGTTTCGCTTCTGAATTG	57

Condições utilizadas na PCR foram: Desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos por 40 ciclos de 45 segundos a 94°C. Fase de anelamento de 40 segundos na temperatura de melting ideal de cada primer indicada na tabela 3, seguido de 45 segundos a 72°C. Extensão final de 5 minutos a 72°C.

3.5.4 Alinhamento e análises filogenéticas das cepas isoladas

As sequências obtidas através do sequenciamento realizado utilizando a técnica de Sanger [113] foram ajustadas e alinhadas utilizando o programa Bioedit v.7.0.5.3 [114] e os resultados encontrados foram analisados através da ferramenta BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para analisar a relação evolutiva das não-*Saccharomyces* isoladas, inicialmente realizamos o alinhamento das sequências de nucleotídeos de cada isolados com MAFFT [115] usando configurações predefinidas. Posteriormente usamos jModelTest [116] para estimar o modelo de substituição nucleotídica mais adequado, usado para inferir relações filogenéticas de máxima probabilidade entre OBPs com PhyML ver.3.0 [117].

3.6 Análise da capacidade de crescimento das *Saccharomyces* isoladas em mosto de uva Syrah

Todas as cepas identificadas como *Saccharomyces* a partir das análises de genotipagem foram analisadas quanto a capacidade de crescimento em mosto de uva syrah. O mosto utilizado para essa análise apresentou 22°BX (graus BRIX: escala numérica que mede a quantidade de sólidos solúveis no mosto) o que corresponde à 22% de açúcares presentes nesse mosto.

Para isso fizemos um cultivo das cepas em meio YPD 2% *overnight*. Após esse período padronizamos todas as cepas para densidade óptica de 0.1 (DO₆₀₀) à 20 ml e monitoramos seu crescimento durante 8 horas à 30°C sobre agitação de 180 G. Comparamos o desempenho de cada cepa em relação a condição controle (cepas cultivadas em meio líquido YPD 8%), o crescimento das cepas foi analisado a cada ciclo celular através da densidade óptica de 600nm. Após esse período, realizamos uma diluição em série 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³ e 10² das amostras e através da técnica de *dropout* cultivamos 5 µl das diluições que foram realizadas com as diferentes cepas isoladas e também com os controles em placa com meio sólido YPD 2% e em placa com mosto e ágar (500 ml de mosto de uva acrescido de 20 g de ágar com pH ajustado para 8).

A viabilidade celular foi verificada após 24 e 48 horas e comparadas aos controles (cepas comerciais).

3.7 Análise da capacidade de crescimento das cepas de *Saccharomyces* isoladas em meio contendo metabissulfito de potássio

As cepas de leveduras que apresentaram melhor desempenho durante as análises anteriores, foram avaliadas quanto a capacidade de crescimento em meio YPD 8% (2% de peptona, 1% extrato de levedura e 8% de dextrose) contendo o composto metabissulfito de potássio.

A análise foi realizada da seguinte forma:

Em tubos cônicos com 20 ml do meio YPD 8% foram adicionadas as concentrações de metabissulfito de potássio de 0,1, 0,2, 0,4 e 0,8 g/L de acordo com técnica descrita por Bassi e colaboradores [118]. Utilizamos também somente o meio líquido YPD 8% (sem adição do composto) para controle dos resultados.

As cepas foram normalizadas para uma densidade óptica de 0,1 (DO_{600nm}) em 20 ml dos respectivos meios e então cultivadas sob agitação de 180 G à 30°C por um período de 8 horas, onde a taxa de crescimento foi analisada a cada 2 horas através de densidade óptica de 600nm [21; 118].

Logo após esse período foi realizado uma diluição seriada dos diferentes cultivos 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2 , cultivando através de *dropout* apenas 5 µl de cada diluição em placa com meio sólido YPD 2% e incubadas à 30°C. A viabilidade das cepas foi analisada em relação aos controles por 24 horas.

3.8 Produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S)

As cepas de leveduras *Saccharomyces* nativas isoladas foram avaliadas quanto a capacidade de produzir o gás sulfeto de hidrogênio utilizando o meio ágar LA (40 g/L de glicose, 5 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de peptona, 0,2 g/L de sulfato de amônio, 1 g/L de acetato de chumbo e 20 g/L de ágar), seguindo a metodologia descrita por Ono e Jiranek et al. [119; 120].

As leveduras foram cultivadas à 37°C durante três dias, para visualizar a produção do gás, onde a coloração que cada cepa apresenta durante esse período é analisada. Cepas produtoras desse gás apresentam coloração de marrom enegrecida, devido a reação que ocorre entre o sulfeto de chumbo presente no meio e o H₂S produzido pelas cepas. As cepas que não produzem H₂S apresentam coloração branca.

3.9 Caracterização das cepas de *Saccharomyces* isoladas resistentes a diferentes concentrações de glicose

As cepas isoladas foram analisadas de acordo com resistência que apresentam a diferentes concentrações de glicose, para isso elas foram submetidas ao crescimento ao longo de oito horas em meio líquido de YPD 8% (20 g/l peptona, 10 g/L extrato de levedura e 80 g/L de dextrose para cada 1 litro de água esterilizada), acrescido do estressor seguindo a metodologia descrita por Prado et al. [121].

Em tubos cônicos com 20 ml de meio YPD 8% as cepas foram padronizadas para uma concentração inicial de células de 0,1 (DO600nm), posteriormente foram inoculadas nos diferentes tubos com as concentrações de 20%, 25%, 30% e 35% de glicose. As cepas também foram analisadas em meio YPD 2% (condição sem estresse).

Em todas as condições as cepas foram incubadas sob agitação de 180 G à 30°C durante 8 horas e a cinética de crescimento foi verificada a cada ciclo celular através da densidade óptica de 600nm. Após esse período realizamos uma diluição de cada cultivo (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2) e através da técnica de *dropout* cultivamos 5 µl de cada diluição em placa com meio sólido YPD 2%, onde a sobrevivência das células foram analisadas.

3.10 Caracterização das cepas de *Saccharomyces* isoladas resistente a etanol

Todas as cepas isoladas foram analisadas de acordo com resistência que apresentam ao etanol. Para realizar essa análise utilizamos o método de contagem de células na câmara de Neubauer para alcançar um total de $2 \cdot 10^6$ células inicial.

Utilizando essa concentração inicial de células submetemos as diferentes cepas ao crescimento por 12 horas em meio líquido de YPD 2% acrescido de etanol 10%, 12% e 14%, seguindo a metodologia descrita por Prado et al. [121].

As cepas também foram analisadas em meio sem adição do estressor a fim de comparação. Para concluir a análise, realizamos uma diluição de cada cultivo (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2) cultivando apenas 5 µl de cada diluição através de *dropout* em placa com meio sólido YPD 2%, onde analisamos a sobrevivência das células.

3.11 Identificação das cepas de leveduras termotolerantes

Com o intuito de identificar a temperatura ótima de crescimento das cepas de leveduras isoladas no ambiente vitivinícola, testamos o gradiente de temperatura de 18°C, 20°C, 25°C, 30°C e 35°C os quais ocorrem o processo de vinificação.

As cepas foram cultivadas *overnight* em agitação de 180 G a 30°C, posteriormente foi realizada uma diluição seriada de cada cultivo 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2 . Através da técnica de *dropout* cultivamos 5 µl dos diferentes cultivos em placa de petri contendo meio sólido YPD 2% e incubamos nas respectivas temperaturas de análise, o crescimento celular foi observado durante 24 horas em relação ao crescimento apresentado pelas cepas comerciais.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse trabalho foi realizado em duas etapas, sendo a primeira etapa o isolamento de leveduras nativas do ambiente vitivinícola onde a figura 4 esquematiza as análises que foram realizadas para sua conclusão. Já na segunda etapa, fizemos um acompanhamento do processo fermentativo para analisar a dinâmica de leveduras que ocorria durante este processo e também para isolar e caracterizar as cepas de leveduras que participam do mesmo. Uma representação de como o monitoramento foi realizado está apresentado na figura 5.

Para melhor compreensão trataremos as etapas separadamente nos itens 4.1 e 4.2 a seguir.

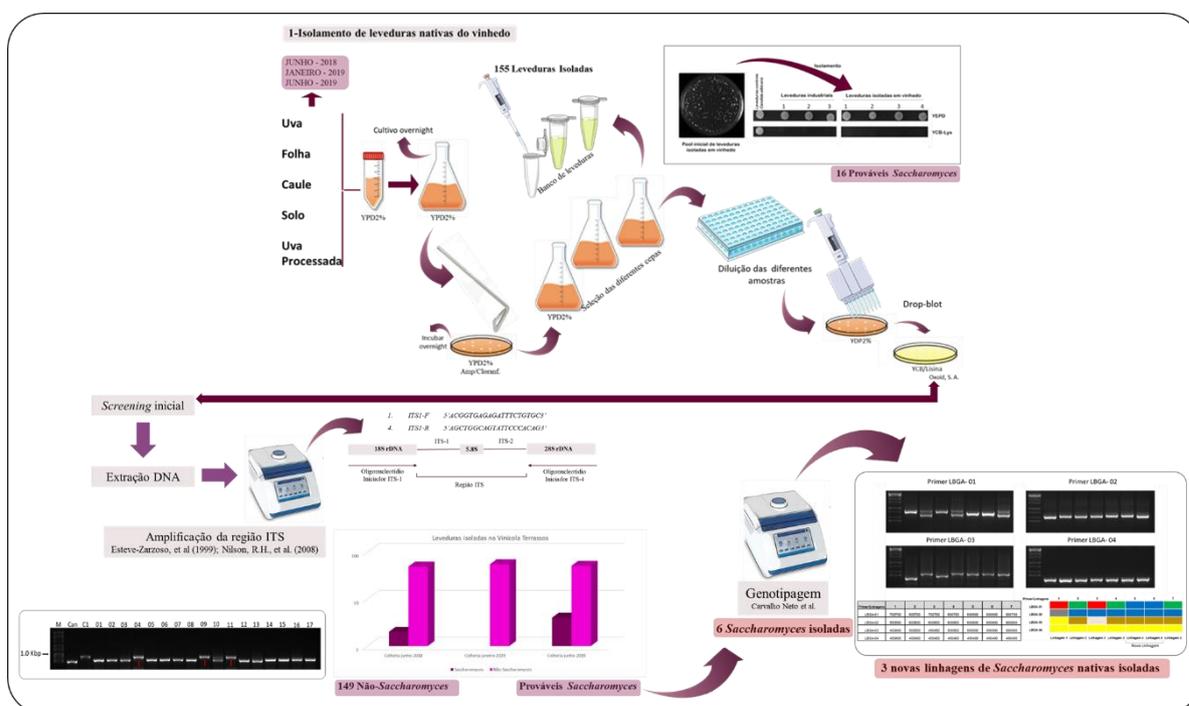


Figura-4 Representação esquemática das análises realizadas para o isolamento e caracterização de leveduras nativas do ambiente vinícola.

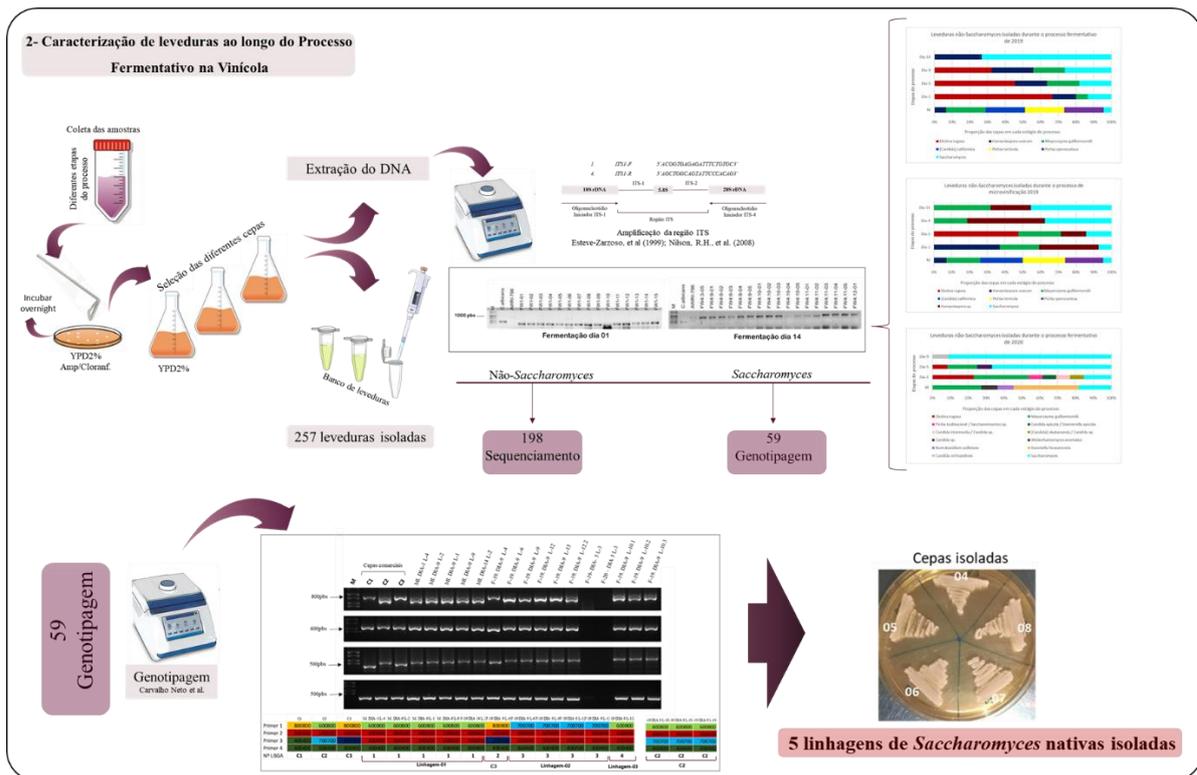


Figura-5 Representação esquemática das etapas realizadas para o monitoramento do processo fermentativo na vinícola Terrassos.

4.1 Isolamento de leveduras do ambiente de produção do vinho

4.1.1 Coleta e seleção das linhagens

Com a intenção de isolar leveduras nativas para produção de vinho acompanhamos a vinícola Terrassos durante as colheitas de junho de 2018, e as colheitas de janeiro e julho de 2019. Durante as colheitas, coletamos amostras do solo, do caule, da folha, do fruto em diferentes regiões dentro da vinícola e também do mosto que estava sendo processado para a fermentação. As Tabelas 2 e 3 resumem as amostragens com suas respectivas coordenadas geográficas.

Tabela 2: Pontos de coleta na Vinícola Terrassos, município de Amparo. Safra junho de 2018, pontos 1 ao 10, e janeiro de 2019, pontos 11 e 12.

Pontos de Coleta	1	2	3	4	5	6
Variedade da Uva	Maximo	Syrah.	Syrah	Syrah	Syrah	Maximo
Latitude (S)	22° 40' 1"	22° 40' 3"	22° 40' 3"	22° 40' 4"	22° 40' 4"	22° 40' 2"
Longitude (W)	46° 7' 30"	46° 47' 20"	46° 47' 29"	46° 47' 29"	46° 47' 29"	46° 47' 30"
Altitude (M)	820	820	810	810	840	840
Amostras Coletadas	Solo	Solo Folha Fruto Caule	Solo Fruto	Solo Fruto Folha	Solo Folha Fruto Caule	Solo

Pontos de Coleta	7	8	9	10	11	12
Variedade da Uva	Maximo	Syrah Italia	Syrah Italia	Syrah Italia	Lorena	Lorena
Latitude (S)	22° 40' 2"	22° 39' 60"	22° 39' 60"	22° 40' 6"	22° 40' 0"	22° 40' 0"
Longitude (W)	46° 7' 29"	46° 47' 36"	46° 47' 37"	46° 47' 31"	46° 47' 31"	46° 47' 32"
Altitude (M)	830	840	850	850	850	840
Amostras Coletadas	Solo	Solo Folha Fruto Caule	Solo Folha Fruto Caule	Solo Folha Fruto	Solo Folha Fruto	Solo Fruto

Tabela 3: Pontos de coleta na Vinícola Terrassos, município de Amparo. Safra julho de 2019.

Pontos de Coleta	1	2	3	4	5	6	7
Variedade da Uva	Salvignon Blanc	Salvignon Blanc	Salvignon Blanc	Syrah	Syrah	Lorena	Lorena
Latitude (S)	22° 40' 1,30"	22° 40' 1,06"	22° 40' 1,43"	22° 40' 0,83"	22° 40' 1,23"	22° 40' 0,85"	22° 40' 0,27"
Longitude (W)	46° 7' 40,98"	46° 47' 40,98"	46° 47' 40,98"	46° 47' 40,41"	46° 47' 39,28"	46° 47' 38,44"	46° 47' 31,71"
Altitude (M)	879	880	877	872	874	872	872
Amostras Coletadas	Solo	Solo	Solo	Solo	Solo	Solo	Solo
	Folha	Folha	Folha	Folha	Folha	Folha	Folha
	Caule	Caule	Caule	Caule	Caule	Caule	Caule

Pontos de coleta	8	9	10	11	12	13
Variedade da Uva	Maximo	Maximo	Syrah	Syrah	Syrah	Syrah
Latitude (S)	22° 39' 59,92"	22° 39' 0,60"	22° 40' 1,27"	22° 40' 1,27"	22° 40' 2,53"	22° 40' 4,60"
Longitude (W)	46° 7' 31,42"	46° 47' 30,97"	46° 47' 29,41"	46° 47' 29,41"	46° 47' 29,77"	46° 47' 28,95"
Altitude (M)	865	858	853	845	835	819
Amostras Coletadas	Solo	Solo	Solo	Solo	Solo	Solo
	Folha	Folha	Folha	Folha	Folha	Folha
		Fruto	Fruto	Fruto	Fruto	Fruto
	Caule	Caule	Caule	Caule	Caule	Caule

Em uma primeira avaliação, todas as linhagens foram caracterizadas como pertencentes ou não ao gênero *Saccharomyces*, utilizando o método de cultivo em placas com meio YCB (*Yeast Carbon Base*) acrescido do aminoácido L-Lisina como única fonte de Nitrogênio. Como citado anteriormente, leveduras não-*Saccharomyces*, tem a capacidade de crescer rapidamente sob estas condições enquanto leveduras do gênero *Saccharomyces* tem pouco ou nulo crescimento nestas condições [122]. Utilizando *C. albicans* como levedura controle não-*Saccharomyces*, e através da incubação de uma única diluição com a mesma concentração celular para todas as linhagens analisadas, foi possível identificar que das 155 leveduras isoladas durante todas as colheitas, 16 destas leveduras poderiam ser consideradas como *Saccharomyces*. Um exemplo de uma das placas testadas está descrito na Figura 6.

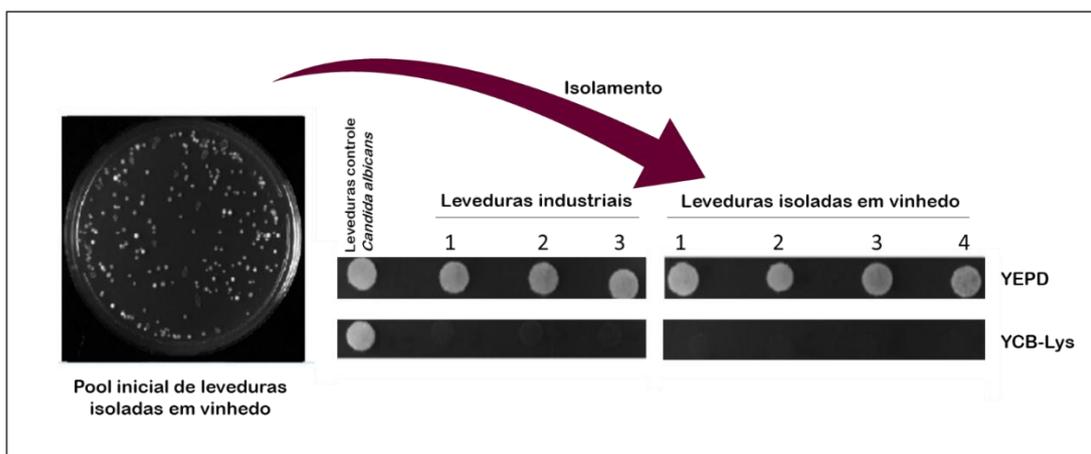


Figura 6: Exemplo de identificação de linhagens *Saccharomyces* em placas YCB-Lisina. Pool inicial de leveduras isoladas em vinhedo. *Drop-blot* das colônias selecionadas do pool inicial em YPD 2% e em placas com YCB/Lisina. As primeiras fileiras das figuras correspondem aos controles, onde: *Cândida albicans* (não *Saccharomyceae*), 1: PDM, 2: BP-725 e 3: AWRI-796 (leveduras do gênero *Saccharomyceae* utilizadas no processo de produção do vinho na vinícola Terrassos). Segunda fileira corresponde as linhagens de leveduras isoladas do vinhedo

4.1.2 Identificação molecular e caracterização das linhagens

Todas as linhagens foram também caracterizadas molecularmente através da amplificação da região 5.8S-ITS do complexo gênico nuclear que codifica para a região 5.8S do RNA ribossômico. Com estas análises, realizamos uma segunda triagem de forma a identificar adequadamente as leveduras não-*Saccharomyces* entre as selecionadas. Após o PCR, o tamanho esperado do amplicon em leveduras do gênero *Saccharomyces* é de aproximadamente 900 pbs [35]. Desta forma, conforme exemplo mostrado na Figura 7, das 155 linhagens identificadas 149 apresentaram tamanhos de amplicons diferentes, as identificando como não-*Saccharomyces* e 6 das 16 leveduras identificadas através do *screening* YCB/Lisina (resultado exemplificado na Figura 6) tiveram seus amplicons com tamanho semelhante ao esperado, as identificando como possíveis *Saccharomyces*.

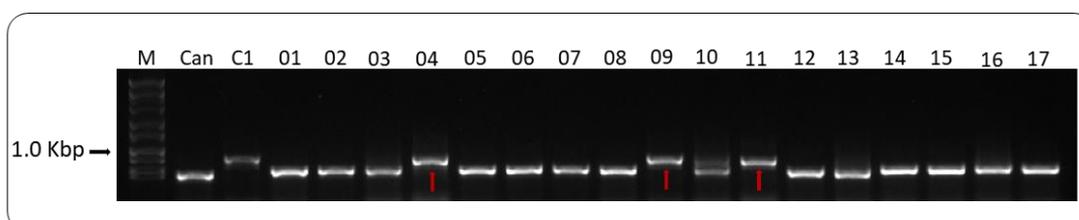


Figura 7: Amplificação da região ITS das cepas isoladas na vinícola Terrassos safra junho 2018, janeiro e julho 2019. Em destaque cepas que tiveram sua região ITS amplificadas de tamanho correspondente ao controle *Saccharomyces*. CAN: *Candida albicans* controle não-*Saccharomyces*; C1: PDM cepa *Saccharomyces* utilizada na produção de vinhos e de 1 a 17 cepas de leveduras isoladas no ambiente vitivinícola.

A amplificação da região ITS tornou possível determinar a proporção de leveduras *Saccharomyces* em relação as não-*Saccharomyces* presentes no ambiente de plantação das uvas nas respectivas colheitas analisadas. Após as análises, encontramos 6 possíveis *Saccharomyces* isoladas, sendo 2 na colheita de junho de 2018 e outras 4 na colheita de junho de 2019. No entanto, na colheita de janeiro de 2019 não foi possível isolar nenhuma levedura com características correspondentes as de leveduras do gênero *Saccharomyces*. A Figura 8 representa todas as colheitas acompanhadas onde comparamos a quantidade de leveduras *Saccharomyces* e não- *Saccharomyces* identificadas em cada colheita.

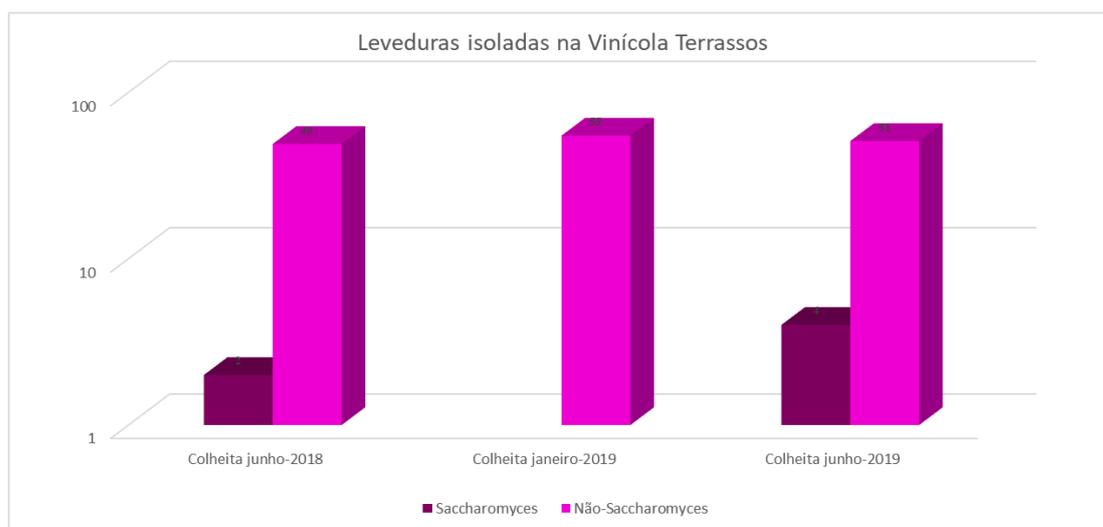


Figura 8: Comparação da quantidade de leveduras *Saccharomyces* com não-*Saccharomyces* de todas as coletas realizadas nas diferentes colheitas.

Entretanto, leveduras muito próximas filogeneticamente às *Saccharomyces* podem apresentar tamanho similar de amplicon. Visando buscar uma melhor caracterização desse grupo, fizemos uma nova diferenciação utilizando a técnica de genotipagem descrita por Carvalho-Neto e colaboradores [123]. Esta técnica permite a discriminação de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e a diferenciação de linhagens não-*Saccharomyces*. Assim fizemos a discriminação das *Saccharomyces* isoladas no vinhedo com a intenção de selecionar linhagens nativas diferentes entre si. Em especial que seja diferente das cepas comerciais utilizadas pela vinícola no processo fermentativo, pois estas leveduras podem dispersar no ambiente vitivinícola.

Após conclusão da análise identificamos que das 6 cepas de leveduras *Saccharomyces* isoladas no ambiente da vinícola, 2 delas, a LBGAv-04 e a LBGAv-07 apresentam padrões de amplicons idênticos ao padrão apresentado pela levedura comercial BP-725, utilizada como controle (C2). Já as outras 3 cepas isoladas; LBGAv-05, LBGAv-06 e LBGAv-08 apresentaram um padrão de amplicons diferentes das cepas

comerciais assim como diferentes entre si. Porém podemos identificar que a cepa LBGAv-01 apresenta o mesmo padrão de amplicons que a cepa LBGAv-05. Portanto foi possível isolar somente 3 novas cepas de levedura *Saccharomyces* nativa diferente das cepas comerciais colonizando o ambiente vitivinícola.

Isolar cepas comerciais no ambiente vitivinícola já é esperado, logo que a prática de adubação do solo com os resíduos decorrentes do processo fermentativo é frequente nesta vinícola.

A figura 9 representa os padrões de amplicons apresentados pelas linhagens isoladas no ambiente vitivinícola e também das cepas comerciais.

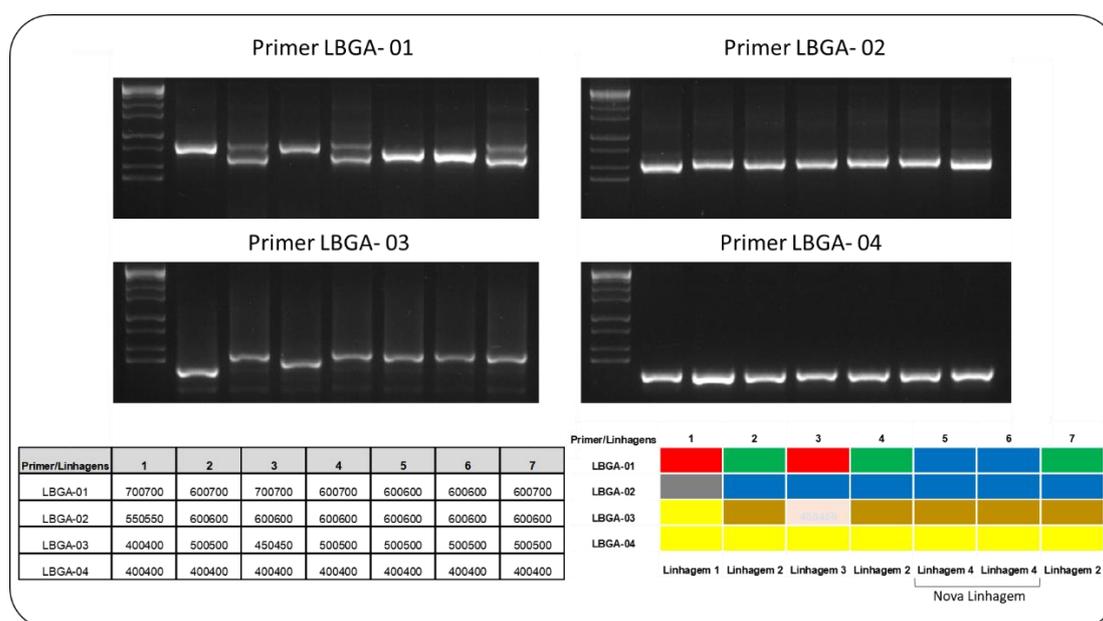


Figura 9: Caracterização molecular de linhagens isoladas do ambiente da vinícola. Quatro regiões polimórficas dos genes *SPA2* (Primer LBGA-01), *PYR3* (Primer LBGA-02), *MNN4* (Primer LBGA-03) e *EPL1* (Primer LBGA-04), foram amplificadas seguindo o protocolo descrito por Carvalho Netto. Linhagem-1: PDM; Linhagem-2: BP-725 e Linhagem-3: AWRI-796, leveduras comerciais utilizada na produção de vinho. Linhagens 4, 5, 6 e 7 leveduras *Saccharomyces* nativas isoladas na região vitivinícola,

4.1.3 Identificação das cepas de leveduras não-*Saccharomyces* que colonizam o ambiente vitivinícola

Para determinar as espécies de leveduras não-*Saccharomyces* que colonizam o ambiente vitivinícola utilizamos a técnica descrita nos itens 3.5.1 e 3.5.2 [35; 112] Os produtos do PCR resultados da amplificação da região ITS de todas as linhagens não-*Saccharomyces* isoladas foram sequenciados através da técnica de Sanger [113] e o resultado foi comparado utilizando a ferramenta BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A partir dessas análises foi possível inferir a microbiota de leveduras não-*Saccharomyces* que colonizam o ambiente vitivinícola e também determinar o tecido onde elas predominam.

Os resultados do sequenciamento serão apresentados nos próximos itens, onde as figuras 10, 11 e 12 estão evidenciando os gráficos que representam as leveduras não-*Saccharomyces* isoladas naquela região e onde elas predominam durante cada colheita analisada. E as figuras 13, 14 e 15 apresentam a relação filogenética entre as cepas de leveduras não-*Saccharomyces* isoladas.

4.1.3.1 Cepas de leveduras não-*Saccharomyces* identificadas na colheita de junho de 2018

Durante a colheita de junho de 2018 foram identificadas não só espécies que predominavam em um tecido em específico, mas também espécies que colonizam vários tecidos. De acordo com as análises, a *Candida sp.* é uma espécie de levedura que coloniza folha, fruto e também o mosto, a *Pichia myanmarensis* foi identificada nas amostras da folha, fruto e solo, já a *Aerobasidium sp.* coloniza a folha e fruto. Em contrapartida espécies como: *Hanseniaspora uvarum* e *Candida akabanensis* colonizam majoritariamente a folha, enquanto a *Aerobasidium thailandese*, a *Wickerhamomyces ciferrii* e a *Torulaspota delbrueckii* predominam somente no fruto. A *Diutina rugosa* e a *Kazachstania sp.* foram espécies identificadas somente no solo. Nas amostras referentes ao caule identificamos somente a espécie *Aerobasidium sp.*. Um panorama das cepas identificadas nesta colheita estão representados no gráfico exemplificado na figura 10.

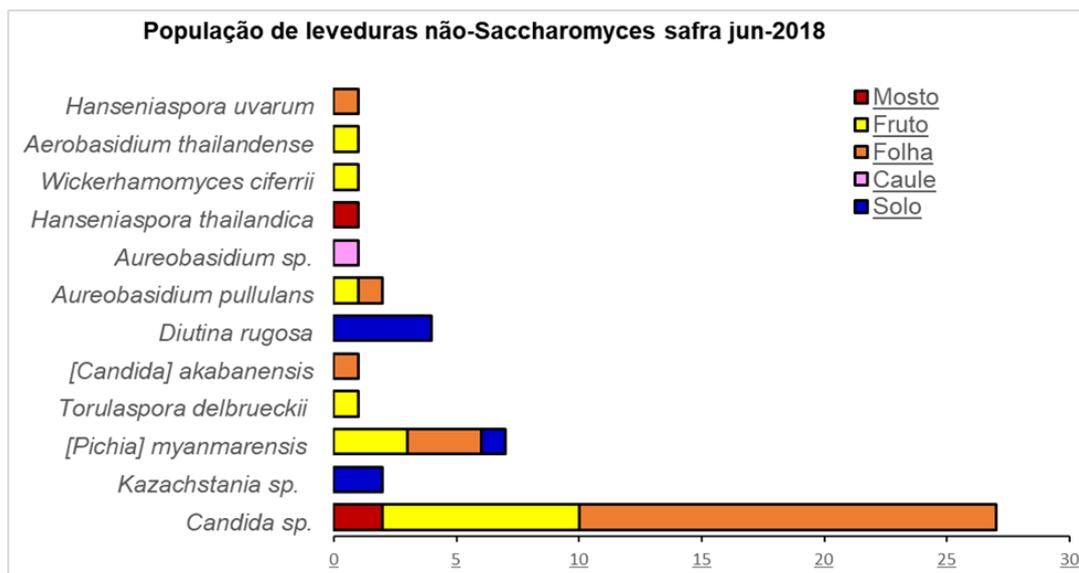


Figura 10: População de leveduras não-*Saccharomyces* identificadas durante a colheita de junho de 2018. Resultados obtidos através do sequenciamento da região ITS das linhagens isoladas e comparados utilizando a ferramenta BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.1.3.2 Cepas de leveduras não-*Saccharomyces* identificadas na colheita de janeiro de 2019

Nas análises referente a esta colheita observamos que algumas espécies de leveduras ainda eram identificadas, como: *Candida sp.*, foi identificada novamente colonizando o mosto, o fruto, a folha e agora também no solo. A *Pichia myanmarensis* continuava presentes na folha e no fruto. Enquanto a *Aerobasidium pullulans*, a *Hanseniaspora uvarum* e a *Diutina rugosa* foram espécies que identificamos se estabelecendo também em tecidos diferentes da colheita anterior.

Nesta colheita observamos também algumas espécies não identificadas na colheita anterior como: a *Starmerella apicola* que foi identificada no solo, a *Pichia kudriavzevii* observamos colonizando o fruto e o mosto, e a espécie *Wickerhamomyces anomalus* encontramos em amostras do solo, da folha, do fruto e também do mosto, da mesma forma identificamos a espécie *Myerozyma guilliermondii* presente na folha, no fruto e no mosto. A figura 11 representa as espécies identificadas durante esta colheita e os respectivos tecidos onde elas foram localizadas.

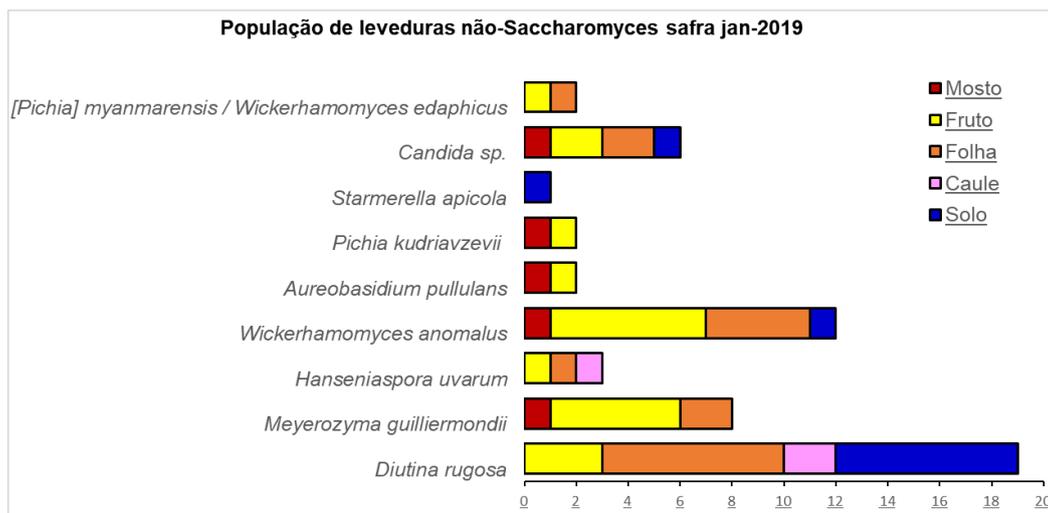


Figura 11: População de leveduras não-*Saccharomyces* identificadas durante a colheita de janeiro de 2019. Resultados obtidos através do sequenciamento da região ITS das linhagens isoladas e comparados utilizando a ferramenta BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.1.3.3 Cepas de leveduras não-*Saccharomyces* identificadas na colheita de junho de 2019

Já nas análises referente a colheita de junho 2019 observamos uma maior diversidade de espécies de leveduras. Algumas dessas leveduras foram encontradas nas análises realizadas em todas as colheitas (junho-2018, janeiro-2019 e junho-2019), é o caso das espécies *Aureobasidium pullulans* e *Candida sp.*. Assim como observamos também algumas espécies identificadas em comum na colheita de junho de 2018 e junho de 2019. A espécie *Wickerhamomyces ciferrii* na colheita de junho de 2018 foi identificada colonizando o fruto e nesta colheita a identificamos também em amostras da folha. *Candida akabanensis* na colheita de junho de 2018 era identificada frequentemente em amostras referentes a folha, nesta colheita a observamos colonizando não só a folha como também fruto. Já *Torulasporea delbrueckii* é uma cepa isolada no fruto na colheita de junho de 2018 e novamente isoladas no mesmo tecido nesta colheita.

Observamos também que algumas espécies eram identificadas somente nesta colheita (junho 2019) como foi o caso da: *Kwoniella heveanensis*, *Pichia sporocuriosa* e *Candida californica* que isolamos das amostras do mosto, e a *Pichia terrícola* além de ser isolada em amostras do mosto estava presente também na folha. A ilustração do padrão de colonização das leveduras está representada na figura 12.

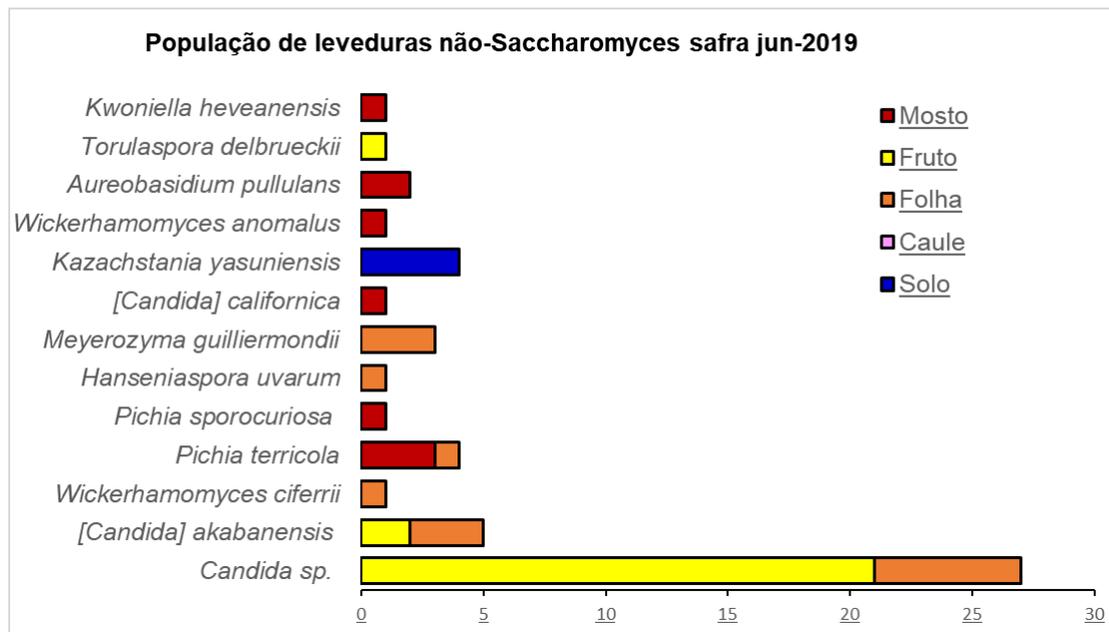


Figura 12: População de leveduras não-*Saccharomyces* identificadas durante a colheita de junho de 2019. Resultados obtidos através do sequenciamento da região ITS das linhagens isoladas e comparados utilizando a ferramenta BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

As análises das três colheitas realizadas pela vinícola, onde o presente trabalho foi desenvolvido, nos sugerem que as espécies de leveduras não-*Saccharomyces* isoladas naquela região são variáveis. Através dos resultados obtidos observamos que algumas espécies permanecem ao longo das colheitas, isto é, já se estabeleceram naquele ambiente, enquanto outras são espécies flutuantes. Como é o caso de *Diutina rugosa* isolada nas colheitas de junho 2018 e janeiro de 2019 e não identificada em junho de 2019. Entretanto, *Torulaspora delbrueckii* foi isolada durante a colheita de junho de 2018 e junho de 2019, enquanto *Candida sp.* e *Hanseniaspora uvarum* eram isoladas durante as três colheitas. Esses resultados nos sugerem que, determinadas espécies tem preferência por uma dada estação do ano como observamos nas espécies de *Wickerhamomyces ciferrii*, *Candida akabanensis* e *Torulaspora delbrueckii*. Outro dado que chama atenção é que *Torulaspora delbrueckii* é uma cepa identificada somente no fruto indicando uma preferência por esse tecido da planta.

A população de leveduras que coloniza o ambiente vitivícola pode ser determinante não só para a qualidade do vinho produzido como também para a saúde das vinhas [124]. Estudos tem demonstrado que, espécies de não-*Saccharomyces* como *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kudriavzevii* e *Meyerozyma guilliermondii* estão diretamente relacionadas à controles biológicos de patógenos que infectam os vinhedos como *Botrytis cinerea*, *Aspergillus carbonaris* e *Penicillium expansum*. Essas espécies de leveduras podem reduzir a incidência desses patógenos através de diferentes

mecanismos como, a produção de enzimas líticas extracelulares e compostos orgânicos voláteis [125], pela produção de biofilmes [126] como também pela síntese de proteínas ligadas à patógenos e a indução do acúmulo de fitoalexinas [127].

4.1.4 Análise da relação evolutiva das cepas de leveduras não-*Saccharomyces* que colonizam o ambiente vitivinícola

Partindo dos resultados obtidos do sequenciamento da região ITS das cepas de leveduras não-*Saccharomyces* encontradas no vinhedo, analisamos também a relação evolutiva entre cada cepa identificada. Inicialmente realizamos o alinhamento das sequencias utilizando os programas Bioedit v.7.0.5.3 e MAFFT [114; 115]. Posteriormente usamos jModelTest [116] para estimar o modelo de substituição de nucleotídeo de melhor ajuste, que foi usado para inferir relações filogenéticas de máxima verossimilhança entre OBPs com PhyML ver.3.0 [117] e agrupá-las de acordo a sua origem evolutiva. Os dados obtidos através desta análise oferecem segurança, pois em geral o suporte dos ramos está dentro do padrão, salvo algumas exceções quando as sequencias são idênticas o que já é esperado.

Durante a análise da relação evolutiva entre as cepas de leveduras não-*Saccharomyces* isoladas, observamos diferentes linhagens agrupadas separadamente e pertencentes ao gênero *Candida*. A topologia da árvore nos sugere, portanto, que se tratam de diferentes espécies identificadas durante as coletas realizadas.

Outro dado a ser considerado é que por conta da alta similaridade na região do ITS que utilizamos para a análise de leveduras, algumas espécies como *Pichia myanmarensis* e *Wickerhamomyces adaphicus* não puderam ser diferenciadas, dificultando uma análise acurada neste sentido. As Figuras 13, 14 e 15 apresentam as árvores filogenéticas representando a relação evolutiva entre as leveduras isoladas em cada colheita.

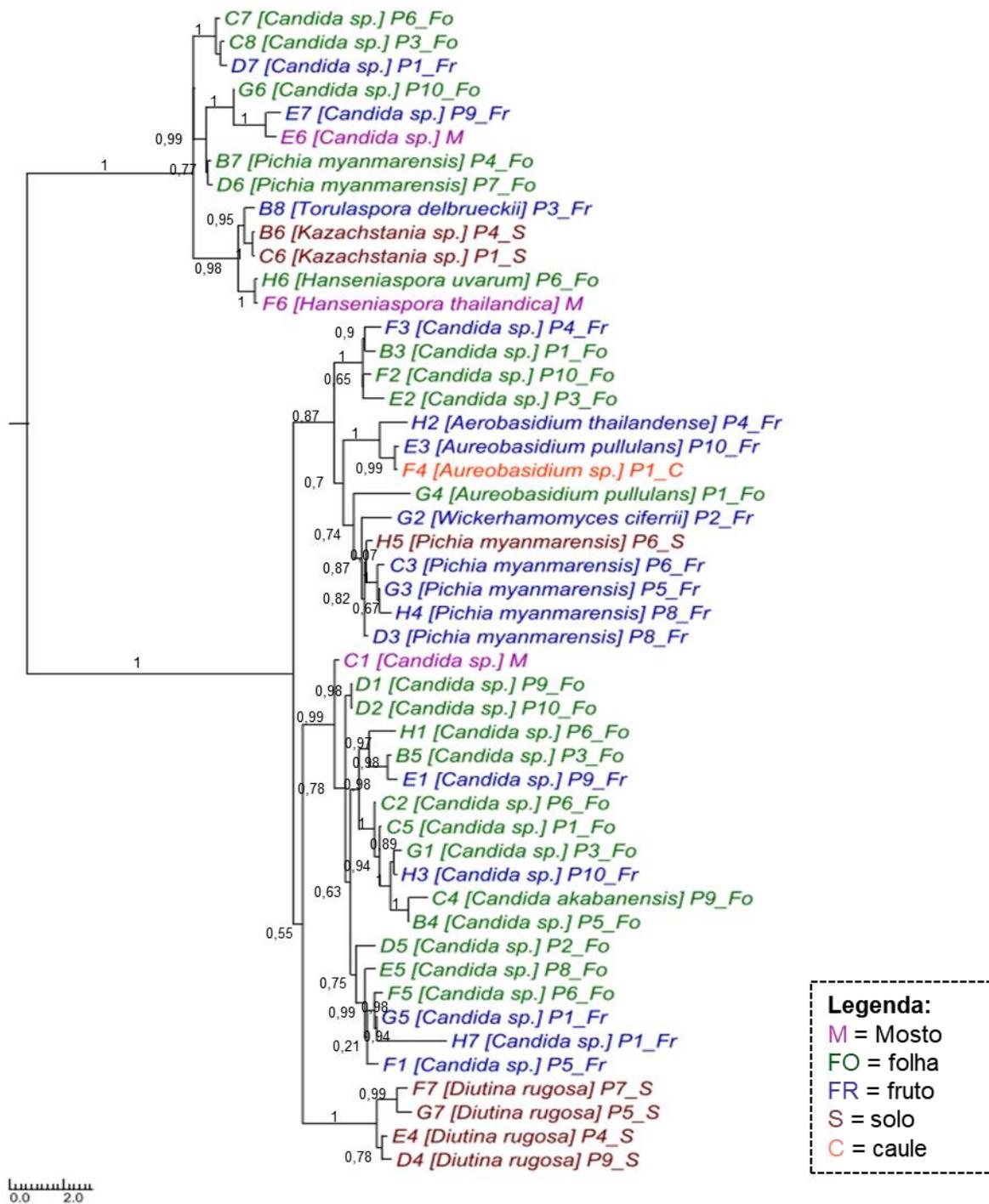


Figura 13: Árvore filogenética representando a relação evolutiva da microbiota existente na região vitivinícola durante a colheita de junho de 2018 representada pela figura 10. Dados obtidos através dos resultados do sequenciamento da região ITS, utilizando os programas de bioinformática [115] para alinhar as sequencias, [116] para inferir um modelo de substituição nucleotídicas e [117] para inferir as relações evolutivas das sequencias. P1: ponto de coleta 1; P2: ponto de coleta 2; P3: ponto de coleta 3; P4: ponto de coleta 4; P5: ponto de coleta 5; P6: ponto de coleta 6; P7: ponto de coleta 7; P8: ponto de coleta 8; P9: ponto de coleta 9; P10: ponto de coleta 10. Os pontos de coletas são referentes as coordenadas geográficas presentes na tabela 2.

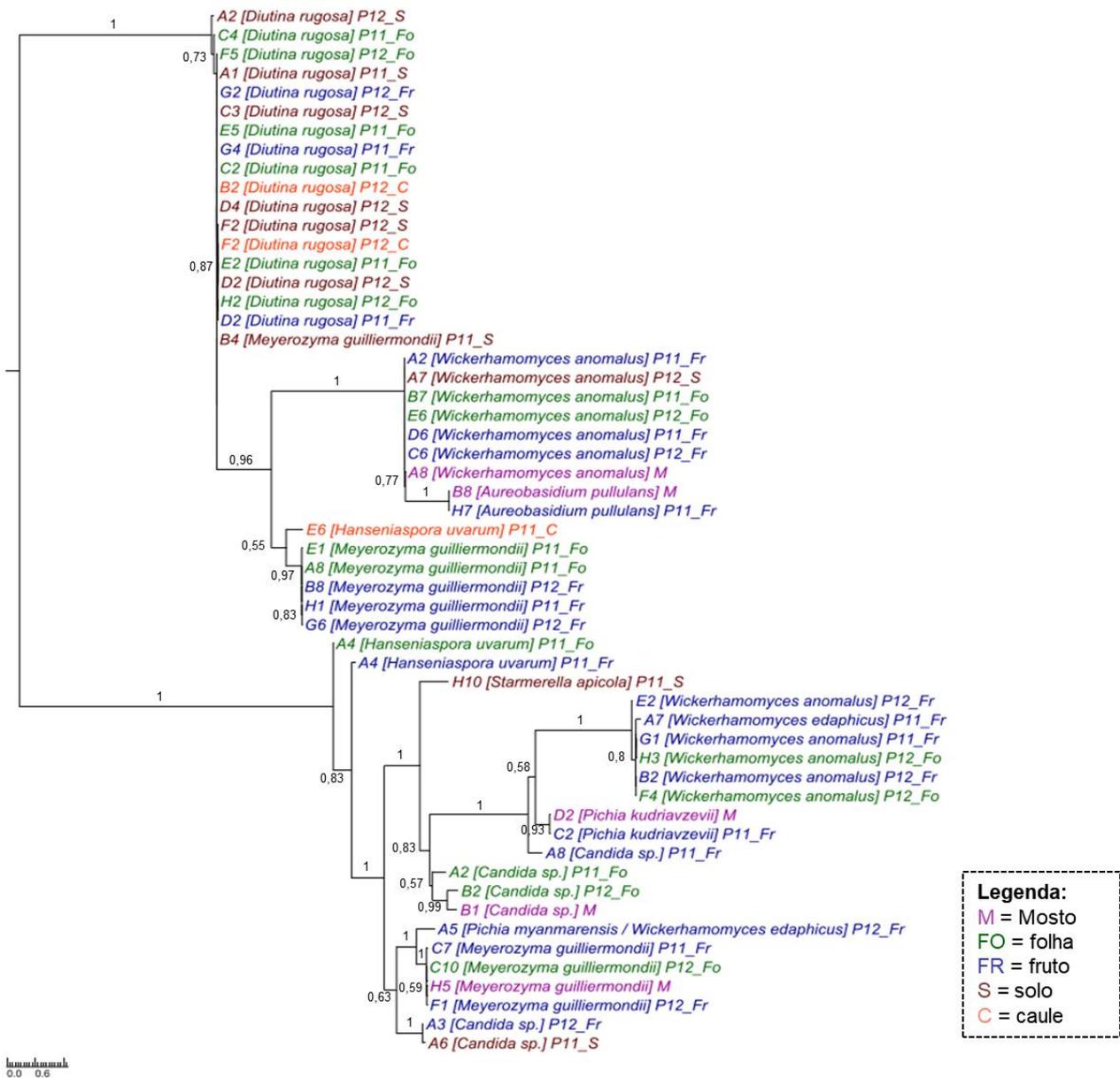


Figura 14: Árvore filogenética representando a relação evolutiva da microbiota existente na região vitivinícola durante a colheita de janeiro de 2019 representada pela figura 11. Dados obtidos através dos resultados do sequenciamento da região ITS, utilizando os programas de bioinformática [115] para alinhar as sequencias, [116] para inferir um modelo de substituição nucleotídicas e [117] para inferir as relações evolutivas das sequencias. P11: ponto de coleta 11; P12: ponto de coleta 12. Os pontos de coletas são referentes as coordenadas geográficas presentes na tabela 2.

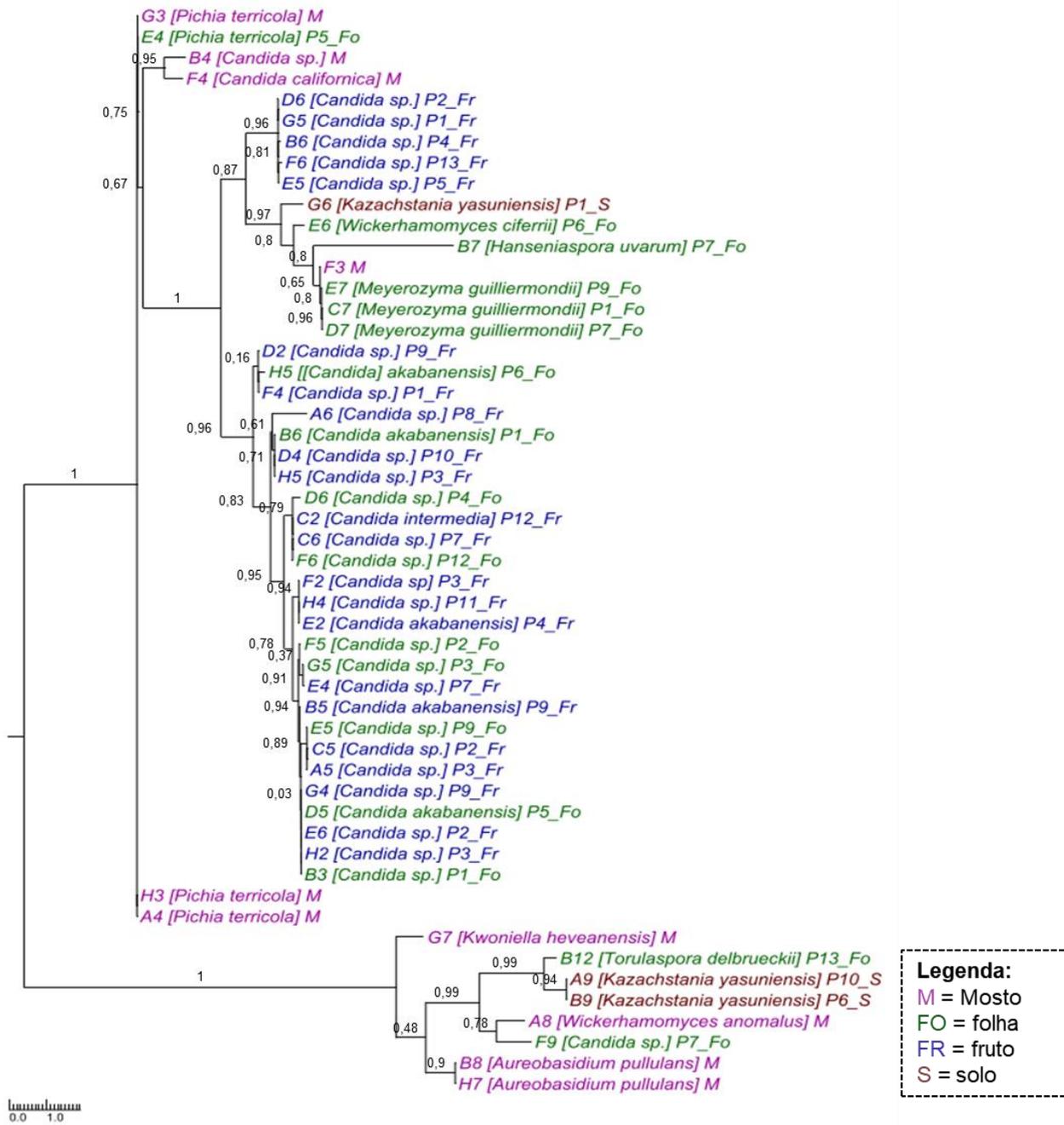


Figura 15: Árvore filogenética representando a relação evolutiva da microbiota existente na região vitivinícola durante a colheita de junho de 2019 representados pela figura 12. Dados obtidos através dos resultados do sequenciamento da região ITS, utilizando os programas de bioinformática [115] para alinhar as sequencias, [116] para inferir um modelo de substituição nucleotídicas e [117] para inferir as relações evolutivas das sequencias. P1: ponto de coleta 1; P2: ponto de coleta 2; P3: ponto de coleta 3; P4: ponto de coleta 4; P5: ponto de coleta 5; P6: ponto de coleta 6; P7: ponto de coleta 7; P8: ponto de coleta 8; P9: ponto de coleta 9; P10: ponto de coleta 10; P11: ponto de coleta 11; P12: ponto de coleta 12; P13: ponto de coleta 13. Os pontos de coletas são referentes as coordenadas geográficas presentes na tabela 2.

4.1.5 Análise dos resultados

Após a análise do ambiente vitivinícola concluímos que, os diferentes tecidos da planta como também o solo é colonizado por uma grande diversidade de leveduras não-*Saccharomyces*, dados representados pela figura 7 e 8 respectivamente. Como discutido no item 4.1.3, essas não-*Saccharomyces* se diferem no decorrer das safras, sendo que, algumas cepas são identificadas em todas as safras analisadas, enquanto outras foram identificadas em safras específicas. Portanto, esse comportamento nos sugere uma preferência dessas cepas por determinadas estações do ano. As figuras 10, 11 e 12 nos permitem identificar as espécies que as não-*Saccharomyces* isoladas pertencem como também correlacioná-las com o tecido em que predominam. Dentre as cepas de não-*Saccharomyces* identificadas estão algumas que contribuem para a saúde das vinhas como *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kudriavzevii* e *Meyerozyma guilliermondii*, estas cepas atuam como controle biológico de patógenos.

Verificamos também a relação evolutiva entre as cepas de não-*Saccharomyces* isoladas. Contudo, os dados obtidos das análises, figuras 13, 14 e 15, demonstraram que isolamos uma diversidade muito maior de espécies comparadas com os dados obtidos pelo BLASTN, figuras 10, 11 e 12.

Além disso, isolamos um total de 6 cepas de leveduras *Saccharomyces* nativas, que, nos estudos de genotipagem representados pela figura 9, três delas apresentaram perfil de amplicons diferentes entre si e diferentes das cepas comerciais, sendo novas linhagens identificadas. Essas novas linhagem permitiram realizar estudos mais abrangentes que serão apresentados em seções posteriores.

4.2 Isolamento e caracterização de leveduras ao longo do processo fermentativo da vinícola

Através dos resultados obtidos do isolamento de leveduras no vinhedo, observando que nas uvas coletadas e no mosto haviam uma grande proporção de leveduras não-*Saccharomyces*. Este resultado sugeriu realizar uma análise mais abrangente a fim de elucidar se estas espécies de não-*Saccharomyces* eram encontradas no processo fermentativo e como elas se comportavam ao longo da fermentação. Uma vez que estas uvas seriam processadas para originar o mosto e este mosto seria inoculado com uma cepa comercial dando início ao processo de vinificação. De acordo com a literatura estas leveduras nativas participam do processo fermentativo e contribuem significativamente para as características sensoriais do vinho [7; 10].

Para determinar a dinâmica do processo fermentativo da vinícola Terrassos, realizamos um monitoramento deste processo por dois anos consecutivos. O primeiro foi realizado em janeiro de 2019, onde também realizamos coleta de amostras do território vitivinícola, isto é, coletamos amostra do solo, do caule, da folha e do fruto. O posterior foi em janeiro de 2020, neste ano não realizamos coleta de amostras do ambiente, realizamos somente o monitoramento do processo fermentativo para então comparar ao ano anterior. Os processos de fermentação monitorados nos dois anos foram realizados utilizando a mesma estirpe de uva para produzir o mosto e também se utilizou a mesma cepa de levedura comercial como iniciadoras (*starter*) do processo.

Para realizar o monitoramento coletamos amostras do mosto antes do inóculo com a levedura comercial, no início (horas após a inoculação da cepa comercial), meio e no final da fermentação, com o intuito de analisar as cepas que predominavam em cada estágio do processo fermentativo. Quantificamos também o consumo de açúcares totais em cada etapa. Em adição, no monitoramento realizado em janeiro de 2019, utilizamos o mesmo mosto que estava sendo vinificado pela vinícola para realizar uma microvinificação em escala laboratorial, simulando o processo fermentativo realizado pela vinícola. A vinificação em microescala (microvinificação) e o processo fermentativo da vinícola foram monitorados e analisados com os mesmos parâmetros. Dessa forma, comparamos a dinâmica dos dois processos (fermentação da vinícola e vinificação em microescala).

Os resultados obtidos através do monitoramento do processo fermentativo de 2019 e 2020 serão apresentados em detalhes a seguir de acordo com a data em que foram realizados.

4.2.1 Dinâmica de leveduras durante o processo fermentativo

A partir das coletas realizadas em dias estratégicos dos processos fermentativos, isolamos um total de 257 cepas de leveduras. Essas diferentes cepas foram submetidas à extração do DNA utilizando a técnica de fenol-cloroformio [112]. Logo após, através de PCR amplificamos a região 5.8S-ITS do complexo gênico nuclear. Além disso todas as cepas identificadas como não pertencentes do gênero *Saccharomyces* tiveram o produto resultado da amplificação da região ITS sequenciados [113]. Essa análise foi importante pois através dela identificamos a proporção de leveduras *Saccharomyces* e não-

Saccharomyces que participam dos processos fermentativos monitorados possibilitando também inferir a etapa do processo onde elas predominam.

A figura 16 demonstra um exemplo dos padrões de amplificação obtidos da região ITS das amostras coletadas durante a fermentação da vinícola, no primeiro dia e no décimo quarto dia de fermentação. Utilizando essa técnica identificamos 59 prováveis *Saccharomyces* e 198 não-*Saccharomyces*. Realizamos também um levantamento da proporção de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* que foram isoladas ao longo dos processos analisados. A figura 17 apresenta graficamente os dados obtidos a partir da amplificação da região ITS de todas as cepas isoladas. Nessa figura podemos comparar a proporção de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* isoladas durante a fermentação como também as etapas do processo fermentativo que predominam.

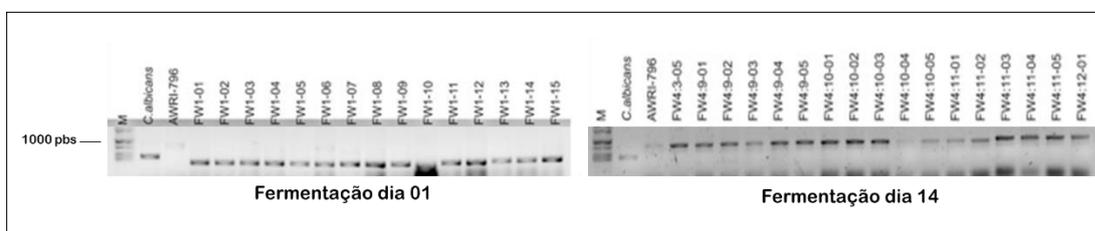


Figura 16: Exemplo dos géis de agarose da amplificação da região ITS das cepas isoladas dos processos fermentativos. *C. albicans*: controle não-*Saccharomyces*; AWRI-796: cepas comerciais de leveduras *Saccharomyces* utilizadas pela vinícola Terrassos; FW1: linhagens isoladas no primeiro dia da fermentação e FW4: linhagens isoladas no décimo quarto dia da fermentação.

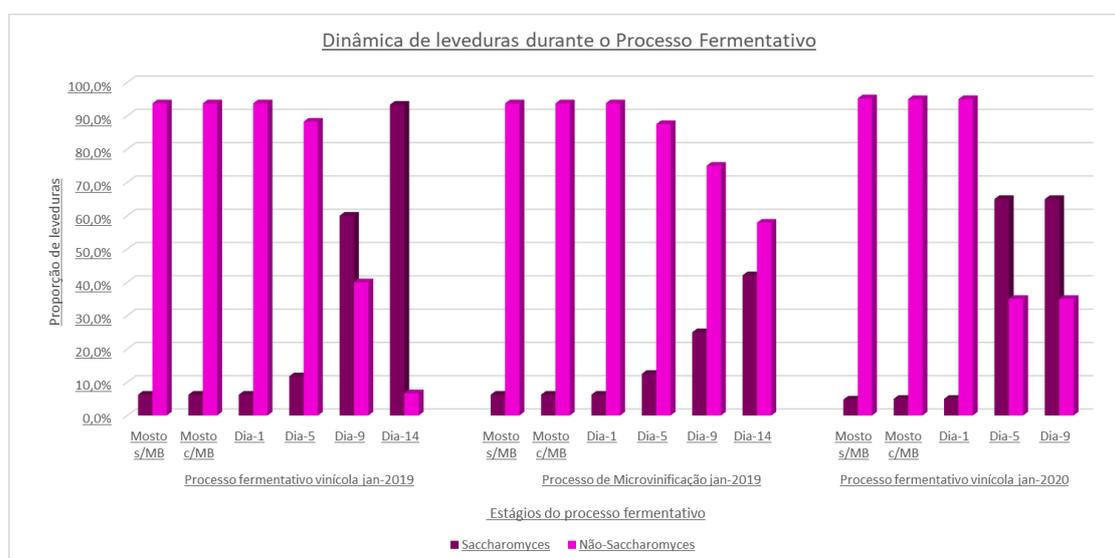


Figura 17: Sucessão de leveduras ao longo dos processos fermentativos monitorados. Processo fermentativo janeiro de 2019: processo fermentativo realizado pela Vinícola Terrassos e microvinificação em escala laboratorial, resultados exemplificados das amostras do mosto sem adição de metabissulfito de potássio e após adição com tempo de fermentação de 14 dias. Processo fermentativo janeiro de 2020 processos fermentativos realizado pela vinícola, mosto sem adição de metabissulfito de potássio e após adição com tempo de fermentação de 9 dias.

Os processos de fermentação alcoólica analisados (Processo fermentativo realizado pela vinícola em 2019 e 2020 e vinificação em microescala que foi realizada simultaneamente com o processo fermentativo de 2019) apresentaram as seguintes características:

Em janeiro de 2019, ano em que além de monitorar o processo fermentativo realizado pela vinícola, também fizemos uma vinificação em microescala para comparar a dinâmica de ambos os processos. Tanto no mosto sem adição de metabissulfito (composto utilizado para esterilizar o mosto), e com a adição deste composto, foram observadas leveduras *Saccharomyces* de proporção inferior as não-*Saccharomyces* antes da inoculação da cepa comercial. A mesma condição foi observada no mosto 12 horas após o inóculo até o quinto dia do processo. Em contrapartida, no nono dia da fermentação os dois processos se diferiram.

Na fermentação realizada pela vinícola foi observado que as leveduras *Saccharomyces* estavam em maior proporção que o observado nos pontos anteriores de coleta, condição perpetuada até o décimo quarto dia resultando no declínio das cepas não-*Saccharomyces*.

No processo de vinificação em microescala, a partir do nono dia até o décimo quarto as leveduras *Saccharomyces* eram observadas ainda em menor proporção que leveduras não-*Saccharomyces*.

Acreditamos que a divergência dos resultados seja devido à vinificação em microescala ter sido realizada de maneira estéril, enquanto a vinificação realizada na vinícola esta suscetível a ação da microbiota existente naquela região. Em outras palavras, na vinícola o processo não é estéril.

Já nas análises realizadas no processo fermentativo de janeiro de 2020, no mosto com e sem adição de metabissulfito de potássio identificamos leveduras *Saccharomyces* em uma proporção muito baixa. Característica que era observada até os primeiros dias do processo, fase onde já havia ocorrido a inoculação da cepa comercial. A partir do quinto dia do processo, observamos que essas leveduras predominavam totalmente tendo o processo fermentativo finalizado no nono dia de fermentação.

Ao fazer uma comparação com o processo anterior, realizado no ano de 2019 podemos observar que, leveduras *Saccharomyces* dominaram precocemente o processo otimizando o tempo da fermentação.

De acordo com os dados fornecidos pela vinícola Terrassos, a qualidade organoléptica do vinho resultado dos processos fermentativos analisados foi muito

distinta. No ano de 2019 o vinho produzido apresentou uma característica mais marcante e robusta em contra partida o vinho produzido no ano posterior em 2020 apresentou notas mais finas e frutadas.

Os dados que obtivemos das análises nos sugerem que a microbiota de leveduras não-*Saccharomyces* influenciaram diretamente na característica dos vinhos resultantes dos processos analisados, uma vez que ambos os processos foram realizados utilizando mosto originado da mesma estirpe de uvas e inoculado com a mesma cepa comercial. Estes resultados nos indicam que o conhecimento dessa diversidade pode ser importante quando se busca vinhos com características semelhantes.

No item 4.2.3 demonstraremos as cepas de leveduras não-*Saccharomyces* identificadas ao longo de cada processo fermentativo analisado como também sua proporção quando comparadas com as cepas de leveduras *Saccharomyces*.

Vale ressaltar, que no início dos processos fermentativos analisados encontramos leveduras *Saccharomyces* em proporções inferiores as não-*Saccharomyces*. Fato que nos chama atenção é que, conforme a literatura, leveduras *Saccharomyces* pode ser observada em maior proporção desde os primeiros instantes do processo fermentativo e ao longo deste dominam totalmente. Como demonstrado na figura 17, no processo fermentativo realizado na vinícola Terrassos isso não ocorre.

4.2.2 Análise do consumo de açúcares totais ao longo do processo fermentativo

Para analisar a eficiência das cepas que conduziam os processos fermentativos monitorados, realizamos uma análise do consumo de açúcares totais durante o processo através da técnica que utiliza ácido-3,5-dinitro salicílico (DNS).

No ano de 2019 comparamos o consumo de açúcares durante o processo fermentativo realizado pela vinícola em relação a vinificação em microescala (microvinificação). Já no ano de 2020 fizemos uma comparação do processo fermentativo realizado pela vinícola no ano anterior. E por fim fizemos uma relação do consumo de açúcares às cepas identificadas em cada processo fermentativo.

As análises realizadas representadas pela figura 18 demonstra que no ano de 2019 ambos os processos fermentativos (fermentação vinícola e vinificação em microescala) evoluíram de maneira similar. Em contrapartida no ano de 2020 o processo fermentativo teve um tempo de fermentação menor e o consumo de açúcares ocorreu de forma linear. Essa diferença no tempo de fermentação observado no processo fermentativo do ano de

2019 e 2020 pode ter ocorrido devido a microbiota de leveduras que participava dos processos. Durante a fermentação do ano de 2019 foi possível identificar em maiores proporções leveduras do gênero não-*Saccharomyces* fato que foi observado o contrário no processo realizado em 2020 onde desde os primeiros estágios do processo já era identificado leveduras *Saccharomyces* as quais prevaleceram a partir do quinto dia como podemos observar na figura 17.

O gráfico representado pela Figura 18 nos permite afirmar que, ao longo do processo fermentativo, o consumo de açúcares totais em ambos processos ocorreram de maneira similar. Esse resultado indica que, a diferença observada na população de leveduras não-*Saccharomyces* e também a proporção delas em relação as *Saccharomyces* nos processos fermentativos de 2019 e 2020 não interferiram no consumo de açúcares.

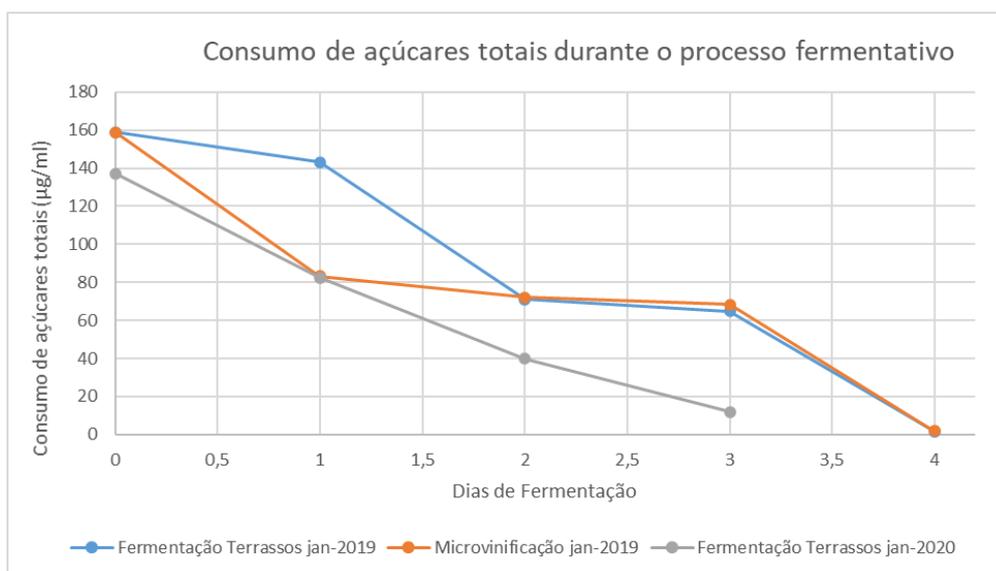


Figura 18: Representação gráfica do consumo de açúcares totais durante o processo fermentativo. Processo fermentativo realizado pela Vinícola Terrassos comparado ao processo de microvinificação ano de 2019 e processo fermentativo da vinícola Terrassos ano de 2020.

4.2.3 Identificação das espécies de leveduras não-*Saccharomyces* que participam do processo fermentativo

Leveduras não-*Saccharomyces* foram identificadas participando ativamente do processo fermentativo. De acordo com a literatura estas espécies podem interferir diretamente na qualidade sensorial do vinho produzido, através da produção de subprodutos oriundos da sua atividade metabólica. Sendo alguns, responsáveis por agregarem altos valores sensoriais como também outros que favorecem para odores desagradáveis e até a degradação do vinho.

Identificar essas espécies é de suma importância para determinar um maior controle sobre o processo fermentativo como também proporcionar a produção de um vinho que apresenta características organolépticas diversificadas.

Diferentes estudos têm demonstrado as contribuições positivas e negativas dessas espécies durante o processo de vinificação, as principais não-*Saccharomyces* relacionadas à produção de vinhos são:

Hanseniaspora: é um gênero de leveduras apiculadas, composto por dez espécies: *H. valbyensis*, *H. guilliermondii*, *H. uvarum*, *H. opuntiae*, *H. Thailandica*, *H. meyeri*, *H. clermontiae*; *H. vineae*, *H. osmophila* e *H. occidentalis* [54]. Este gênero é caracterizado por seu baixo poder fermentativo e alta produção de ácidos graxos voláteis, ésteres, aldeídos e compostos de enxofre, mas baixo produtor de álcoois superiores [55]. Os compostos mais característicos produzidos por *Hanseniaspora* que conferem aroma positivo aos vinhos são ésteres de acetato e aldeídos [54; 56; 57]. A capacidade de produzir baixos níveis de álcoois superiores que esse gênero possui favorece sua aplicação na enologia, já que este composto quando em altas concentrações prejudica a qualidade sensorial do produto.

Candida: é um gênero de leveduras com aproximadamente 150 espécies sendo que 11% são agentes patogênicos que podem causar doenças infecciosas em humanos [58], como por exemplo, a candidíase. Dentro desse gênero encontramos *C. albicans*, *C. stellata*, *C. tropicalis*, *C. akabanensis* entre outras. Porém quando estas espécies estão presentes na fermentação podem influenciar na produção de vinho pois são capazes de produzir uma elevada concentração de compostos prejudiciais para qualidade do vinho como: ácido acético, compostos de enxofre, terpenos e glicerol [59; 60].

Pichia: Dentro do gênero *Pichia*, podemos encontrar aproximadamente 100 espécies como exemplo: *P. anomala*, *P. pastoris*, *P. kluyveri*, *P. kudriavzevii*, *P. angusta*. Esse gênero tem sido descrito como alto produtor de ésteres, principalmente acetato de etila e acetato de isoamila [55], conferindo notas frutadas ao vinho [61]. Espécies de *Pichia* tem sido utilizada em conjunto com *S. cerevisiae* e os vinhos resultante desse processo apresentaram perfil aromático e sabor melhorados, sendo que esses vinhos quando avaliados obtiveram pontuações mais elevadas nos aromas frutados e florais, aparência e paladar, elevando sua qualidade [62; 63].

Meyerozyma guilliermondii: é uma levedura ascomiceta com várias características e fisiologia únicas, pode ser encontrada nos mais diversos ambientes, devido sua capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono [64], possui um rápido

crescimento, e seu crescimento é caracterizado pela formação de filmes. O uso de *Meyerozyma guilliermondii* no processo de vinificação acarreta na melhoria da cor do vinho, essa espécie apresenta uma elevada atividade enzimática que permite a produção de adutos de piranoantocianina, que se condensam com antocianinas presentes no mosto produzindo compostos coloridos altamente estáveis que permanecem por um período de tempo mais longo do que outras antocianinas [62].

Torulaspota: Esse gênero tem sido amplamente estudado devido suas implicações no perfil aromático de vinhos. Dentro desse gênero podemos destacar *Torulaspota delbrueckii* essa espécie tem demonstrado baixa produção de compostos indesejáveis, como acetaldeído, ácido acético e sulfeto de hidrogênio e o concomitante aumento de compostos desejáveis, como 2-feniletanol, ésteres, terpenos e tióis varietais [7; 45; 65]. Além disso, vários estudos têm mostrado que co-fermentações ou inoculação sequencial com cepas selecionadas de *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* resultou em vinhos com qualidade mais complexa e superior que os obtidos por inoculação única, indicando um efeito sinérgico de leveduras na produção de vinho [15; 45; 65; 66].

Aerobasidium: Dentro desse gênero podemos destacar, *Aureobasidium pullulans* e *Aerobasidium thailandense*, são caracterizados como saprófitos oligotróficos oxidativos. Cepas de *Aerobasidium* tem se mostrado como agentes de biocontroles, no trabalho realizado por Felice e colaboradores [72] essas cepas mostraram resistência e capacidade de degradar ocratoxina-A em vinhos. A ocratoxina-A é produzida por espécies de *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus sp.*, quando essas espécies invadem as uvas liberam ocratoxina-A, essas uvas por sua vez serão transformadas em mosto que originará os vinhos podendo então ter a qualidade sensorial prejudicada pela presença desta toxina.

Wickerhamomyces: Cepas desta espécie podem ser encontradas em muitos tipos de ambientes como frutas e materiais vegetais, grãos de cereais, silagem de milho, produtos alimentícios com alto teor de açúcar [33]. *Wickerhamomyces anomalus* pode crescer sob condições extremas de estresse ambiental, como baixo e alto pH, baixa atividade de água, alta pressão osmótica e condições anaeróbias. Em fermentações realizadas com cepas destas espécies foi observado grande desempenho fermentativo nos primeiros estágios do processo e a produção de compostos responsáveis por aumentar o valor gustativo do vinho [75].

Kazachstania: Leveduras do gênero *Kazachstania* normalmente são encontradas em baixa frequência predominando na grande maioria o solo. Leveduras dessa espécie

desempenha baixo potencial fermentativo, mas contribui significativamente para aumentar o sabor em alimentos fermentados por meio da produção de álcool isoamílico [76]. Até agora, somente algumas espécies deste gênero foram enologicamente caracterizados e apresentam aspectos metabólicos favoráveis para aumentar a qualidade sensorial do vinho. No entanto essa espécie não possui condições fisiológicas para conduzir o processo fermentativo até as últimas etapas e é indicada como co-inóculo [77].

***Starmerella*:** Espécies do gênero *Starmerella* são frequentemente isoladas nas flores ou em qualquer outro ambiente de alto teor de açúcares, e estão associadas aos insetos que visitam as flores, como exemplo: abelhas e zangões [78]. Espécie desse gênero tem demonstrado potencial tecnológico relevante como é o caso de *Starmerella bacillaris*, cuja espécie tem apresentado boa performance para atuar como co-inóculo em fermentações para produção de vinhos, pois apresentam tolerância a elevados níveis de etanol podendo persistir até a fase intermediária do processo fermentativo [53]. Além disso, vinhos produzidos com mix de *Saccharomyces e Starmerella bacillaris* apresentaram um perfil aromático de melhor qualidade [80] outro fator que impulsiona o uso dessa espécie para produção de vinhos é o fato de que essa espécie possui uma elevada síntese de enzimas hidrolíticas extracelulares de interesse enológico [46; 53].

Para determinar as espécies de leveduras não-*Saccharomyces* que participam do processo fermentativo, todas as leveduras que não apresentaram seus amplicons de tamanho correspondentes ao padrão esperados de *Saccharomyces* tiveram o produto resultado da amplificação da região ITS purificados e encaminhados para sequenciamento pela técnica de Sanger e comparados utilizando a ferramenta BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Com isso, determinamos as cepas de leveduras não-*Saccharomyces* que participavam do processo fermentativo nas respectivas análises e também as relacionamos com as cepas de leveduras não-*Saccharomyces* identificadas no ambiente vitivinícola. As figuras 19, 20 e 21 apresentam a população de leveduras não-*Saccharomyces* isoladas em cada etapa dos processos fermentativos (processo fermentativo-2019, vinificação em microescala-2019 e processo fermentativo-2020), os quais estão descritos nos próximos itens.

4.2.3.1 Cepas de leveduras não-*Saccharomyces* que participam do processo fermentativo realizado pela vinícola Terrassos e na vinificação em microescala ano de 2019

Durante o monitoramento realizado no processo de produção do vinho na vinícola terrassos no ano de 2019, percebemos que, cepas de leveduras não-*Saccharomyces* eram isoladas com maior frequência em relação as *Saccharomyces*. Através dos resultados obtidos do sequenciamento da região ITS identificamos que as cepas de leveduras não-*Saccharomyces* isoladas durante a colheita nos diferentes tecidos da planta também participavam do processo fermentativo. Essas cepas eram identificadas predominando diferentes etapas do processo, sendo que, algumas delas permaneceram até os estágios finais da fermentação. As análises realizadas permitem inferir que no mosto antes do inóculo da cepa de levedura comercial predomina-se então diferentes espécies de leveduras não-*Saccharomyces* como: *Candida californica*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia terrícola*, *pichia sporocuriosa* e *Meyerozyma guilliermondii*. Mesmo horas após o inóculo do mosto com a cepa comercial, as não-*Saccharomyces* ainda são identificadas em maiores proporções. Algumas dessas cepas declinaram gradativamente, enquanto outras espécies se estabilizavam perpetuando-se até o final do processo. Como exemplo dessa dinâmica podemos citar as espécies de *Diutina rugosa* e *Meyerozyma guilliermondii* que conseguiram atingir até o nono dia do processo, quando posteriormente não são mais observadas, momento em que a espécie *Hanseniaspora uvarum* predomina, competindo com as cepas de *Saccharomyces*. A dinâmica de leveduras que ocorreu durante o processo pode ser conferida no gráfico representado pela figura 19.

Quando comparamos o processo fermentativo realizado na vinícola em relação ao processo de vinificação em microescala (microvinificação), podemos perceber que as cepas de leveduras mantiveram a mesma dinâmica, se diferenciando somente nas espécies que predominam em cada estágios do processo. A figura 20 representa as cepas de leveduras não-*Saccharomyces* identificadas em cada estágio do processo de vinificação em microescala. Como podemos observar o mosto mantém a mesma composição de leveduras em contra partida as cepas de leveduras que predominam no dia 1 do processo se divergem em relação a fermentação realizada na vinícola. *Hanseniaspora uvarum* é uma cepa observada desde o dia 5 da fermentação predominando totalmente na última etapa do processo realizado na vinícola, já na vinificação em microescala, esta cepa desaparece nos primeiros momentos do processo.

Outro aspecto em que os processos se divergem são as espécies que predominam nos últimos estágios do processo. Na vinificação em microescala as cepas que se sobressaem até o último dia da fermentação são *Diutina rugosa* e *Meyerozyma guilliermondii* cepas então observadas predominando os primeiros estágios do processo realizado na vinícola. Vale ressaltar que, em ambos os processos fermentativos leveduras *Saccharomyces* foram identificadas em menores proporções em relação as não-*Saccharomyces*, dados apresentados no item 4.2.1 figura 17.

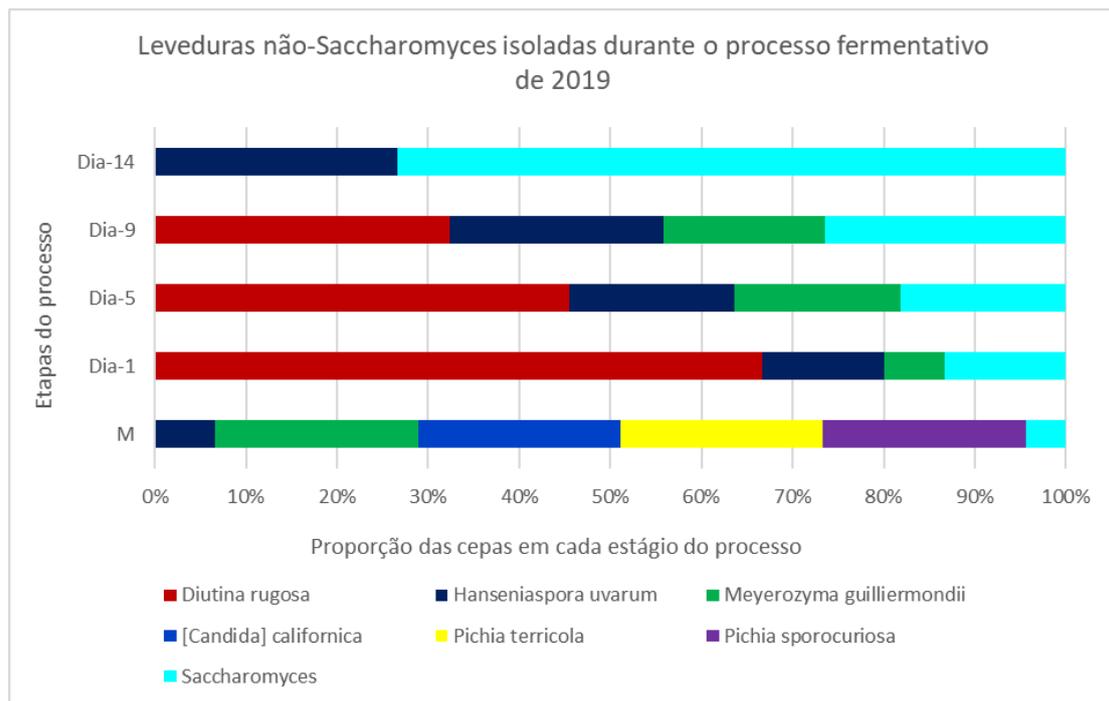


Figura 19: Cepas de leveduras não-*Saccharomyces* identificadas em cada estágio do processo fermentativo realizado pela vinícola Terrassos do ano de 2019. Resultados obtidos através do sequenciamento da região ITS das linhagens isoladas e comparados utilizando a ferramenta BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). M: mosto antes do inóculo da cepa comercial; Dias 1 à 14: tempo de duração do processo fermentativo e os dias em que as coletas foram realizadas.

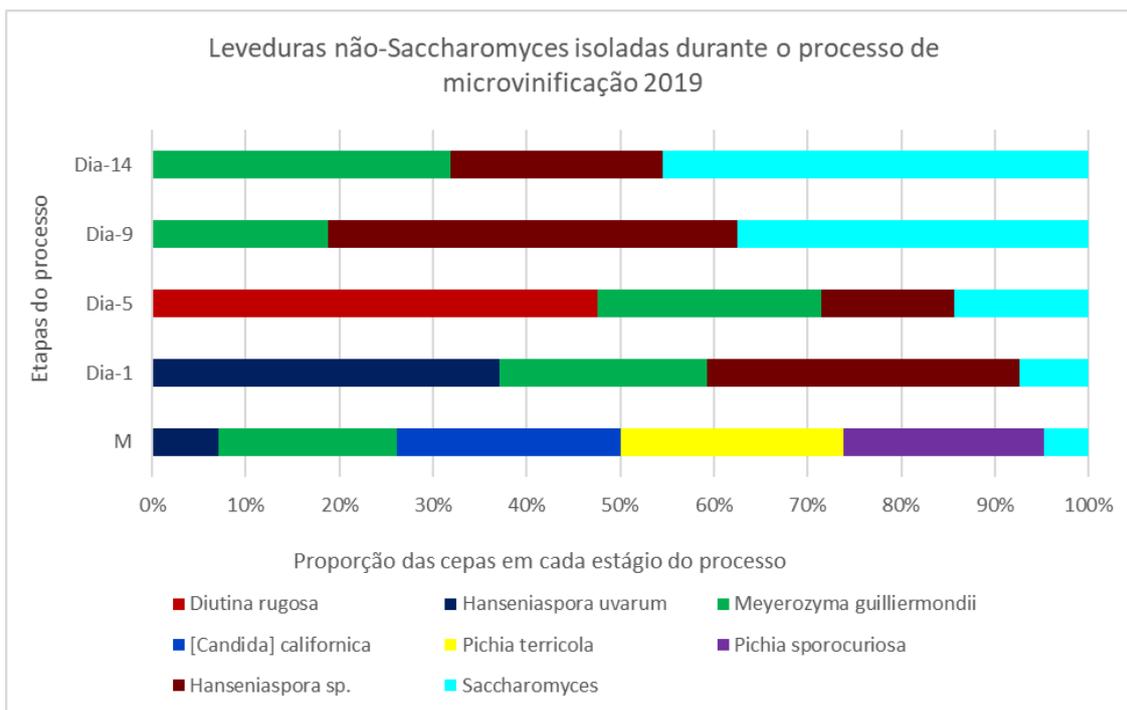


Figura 20: Cepas de leveduras não-*Saccharomyces* identificadas em cada estágio do processo de microvinificação do ano de 2019. Resultados obtidos através do sequenciamento da região ITS das linhagens isoladas e comparados utilizando a ferramenta BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). M: mosto antes do inóculo da cepa comercial; Dias 1 à 14: tempo de duração do processo fermentativo e os dias em que as coletas foram realizadas.

4.2.3.2 Cepas de leveduras não-*Saccharomyces* que participam do processo fermentativo-2020

No ano de 2020 realizamos novamente um acompanhamento do processo fermentativo com o propósito de comparar sua dinâmica ao processo realizado no ano anterior (2019). Neste ano, o processo fermentativo apresentou uma característica diferente, de acordo com os dados apresentados no item 4.2.1 figura 17, as leveduras *Saccharomyces* foram encontradas com maior frequência em comparação ao processo anterior.

Leveduras desse gênero já apareciam no mosto competindo com leveduras do gênero não-*Saccharomyces* como exemplos as espécies *Meyerozyma guilliermondii*, *Candida sp.*, *Aerobasidium pullulans* e *Kwoniella haveanensis*.

Observamos também que a partir do dia 5, cepas de leveduras *Saccharomyces* predominavam, mas ainda era observado algumas espécies de não-*Saccharomyces* que permaneciam até o final do processo. Neste ano o processo fermentativo também se divergiu do ano anterior pelo fato de ter apresentado uma redução no tempo de fermentação. O que chamou a atenção é que nesse processo fermentativo encontramos cepas de leveduras não-*Saccharomyces* diferentes das cepas identificadas no processo

fermentativo de 2019. Como *Pichia kudriavzevii*, *Candida intermedia*, *Candida orthopsilosis*, *Aerobasidium pullulans*, *Candida apícola*, *Candida akabanensis*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Kwoniella heveanensis*.

Na figura 21 podemos verificar todas as cepas isoladas durante esse processo fermentativo e também identificar as etapas do processo que elas predominam.

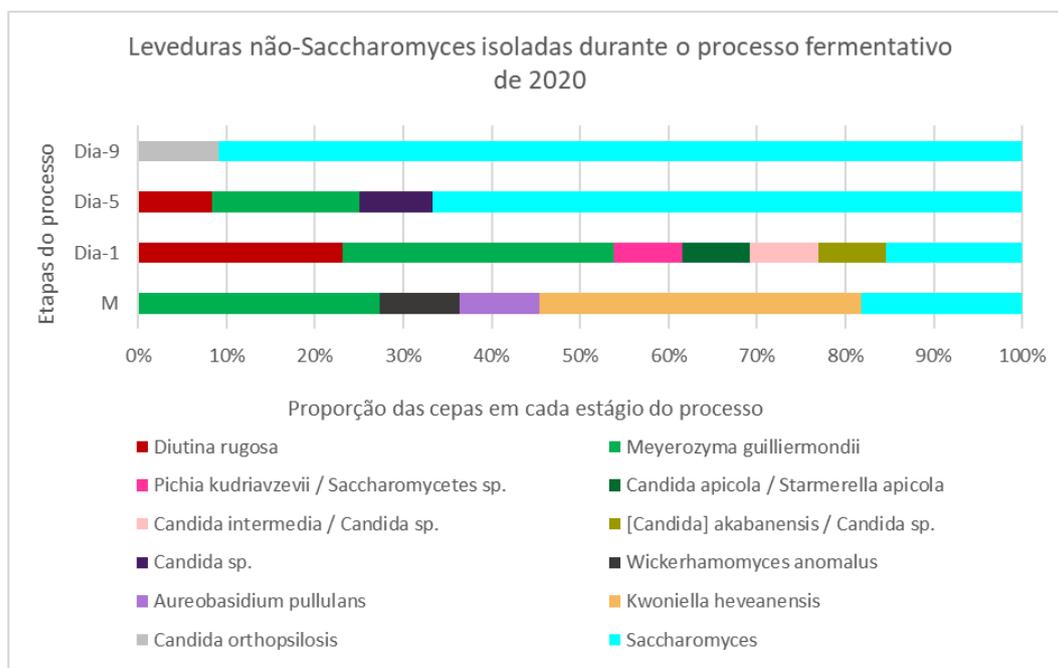


Figura 21: Cepas de leveduras não-*Saccharomyces* identificadas em cada estágio do processo fermentativo do ano de 2020. Resultados obtidos através do sequenciamento da região ITS das linhagens isoladas e comparados utilizando a ferramenta BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). M: mosto antes do inóculo da cepa comercial; Dias 1 à 14: tempo de duração do processo fermentativo e os dias em que as coletas foram realizadas.

Ao fazermos uma comparação dos dois processos fermentativos realizados pela vinícola em 2019 e 2020 podemos observar que:

Em 2019 a espécie *Diutina rugosa*, que também foi isolada em grande proporção no solo da vinícola compete de forma significativa com leveduras do gênero *Saccharomyces* ao longo do processo. Apesar de não ter relação direta com a produção de vinho essa cepa foi identificada em grande quantidade colonizando o ambiente vitivinícola como também participando em todas as etapas do processo fermentativo. Outro ponto a ser observado é que, nesse processo as espécies de *Meyerozyma guilliermondii* e *Hanseniaspora uvarum* também foram observadas nos estágios finais do processo, porém em menores proporções.

Essas espécies são caracterizadas pela capacidade de produzir baixos níveis de álcoois superiores e elevadas concentrações de ésteres de acetato e aldeídos, que conferem

aromas frutados e também contribuem para o corpo do vinho. O que chama atenção no decorrer deste processo é que leveduras *Saccharomyces* são observadas em proporções muito inferiores em relação as não-*Saccharomyces*, indicando que a maior parte do processo foi conduzido por leveduras não-*Saccharomyces*.

No ano de 2020 notamos que a partir do 5º dia já era possível identificar leveduras do gênero *Saccharomyces* predominando, fato não observado no ano anterior. No entanto, era possível encontrar cepas de não-*Saccharomyces* como *Diutina rugosa*, *Meyerozyma guilliermondii* e espécies de *cândida*.

Como já mencionamos no item 4.2.1 os vinhos obtidos dos processos fermentativos analisados apresentaram características distintas o que reforça os resultados que obtivemos das nossas análises.

4.2.3.3 Análise da relação evolutiva entre as cepas de leveduras não-*Saccharomyces* que participam dos processos fermentativos

Logo após identificação das cepas de leveduras não-*Saccharomyces* que participam dos processos fermentativos monitorados, também realizamos uma análise da relação evolutiva entre essas cepas, resultados representados pelas figuras 22, 23 e 24.

Os resultados dessas análises nos mostraram que existem linhagens identificadas como sendo da mesma espécie, mas que se agrupam em clados bem distantes como por exemplo *Pichia terrícola* e *Diutina rugosa* na figura 22, e também das espécies de *Meyerozyma guilliermondii* e *Diutina rugosa* na figura 23. Isto sugere que apesar de serem a mesma espécie podem representar diferentes linhagens que teriam características distintas.

Assim como observado na coleta do ambiente, a similaridade entre as sequências de *Pichia kudriavzevii* com *Saccharomycetes sp.* e também das sequências de *Candida apícola* com *Starmerella apícola*, dificultou a identificação da espécie.

De acordo a topologia que as árvores apresentaram podemos concluir que existe uma diversidade muito maior de espécies participando do processo fermentativo que identificamos pela ferramenta BLASTN.

Esses resultados nos oferecem segurança, pois as análises estão dentro do padrão sendo que o suporte dos ramos apresenta valores muito próximos a 1, salvo algumas exceções quando as sequencias são idênticas, o que já é esperado.

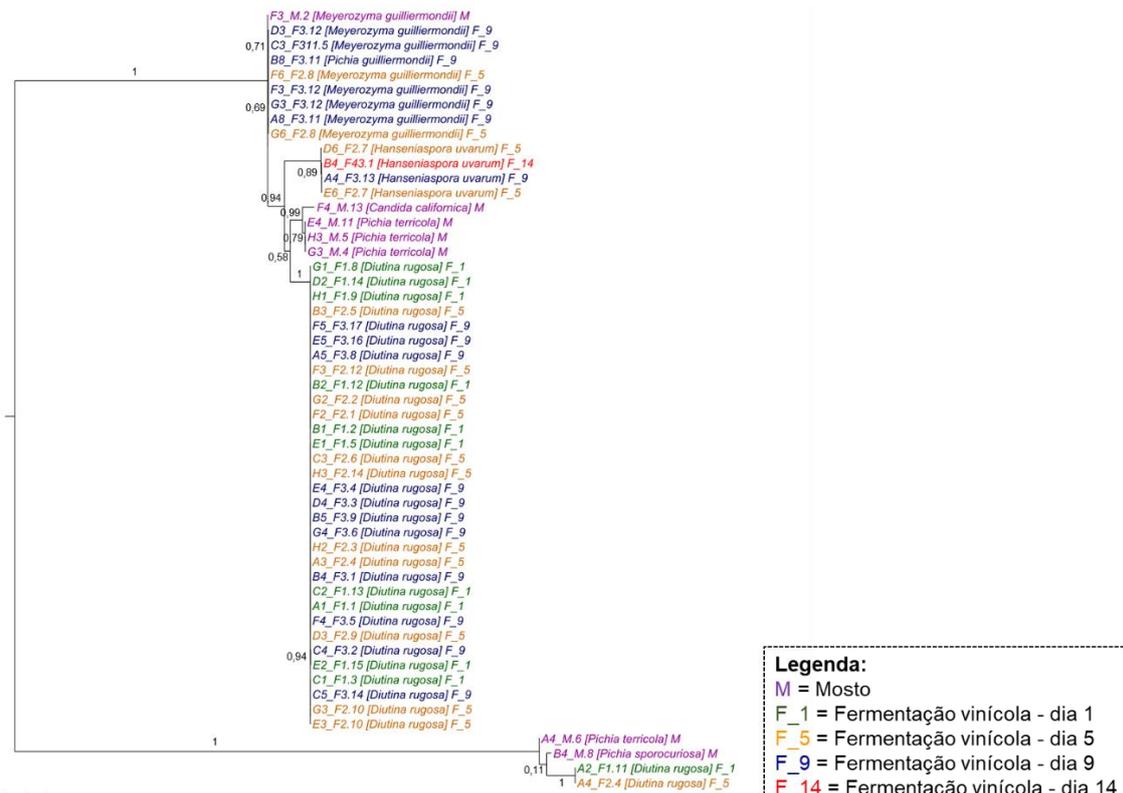


Figura 22: Árvore filogenética representando a relação evolutiva das cepas leveduras não-*Saccharomyces* que participam do processo fermentativo de janeiro de 2019, representados no item 4.2.3.1 pela figura 19. Dados obtidos através dos resultados do sequenciamento da região ITS, utilizando os programas de bioinformática [115] para alinhar as sequencias, [116] para inferir um modelo de substituição nucleotídicas e [117] para inferir as relações evolutivas das sequencias. M: cepas de leveduras isoladas no mosto; F_1: cepas isoladas no primeiro dia do processo; F_5: cepas isoladas no quinto dia do processo; F_9: cepas isoladas no nono dia do processo; F_14: cepas isoladas no décimo quarto dia do processo.

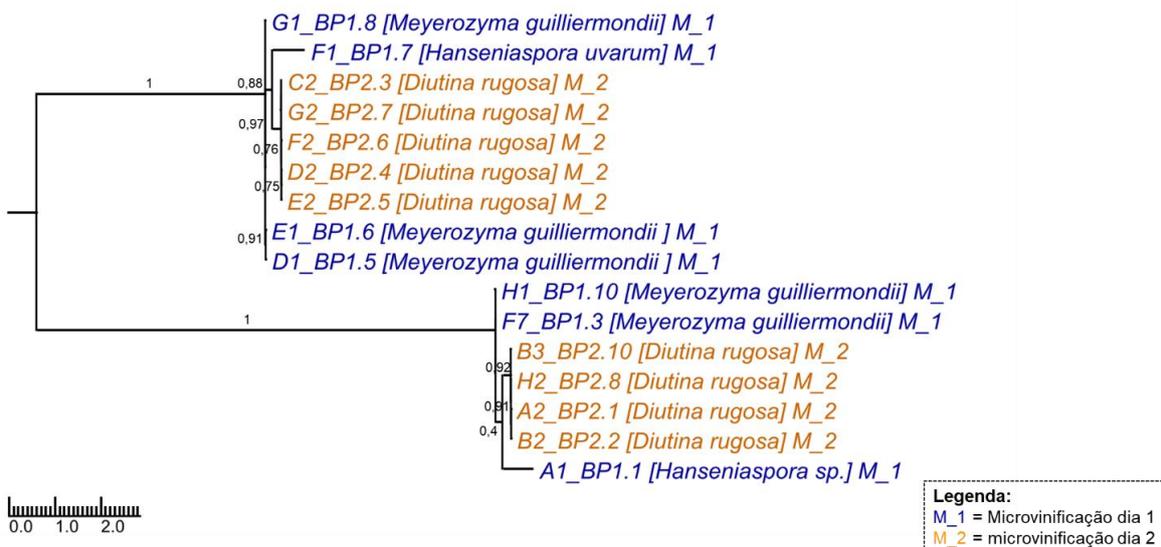


Figura 23: Árvore filogenética representando a relação evolutiva das leveduras não-*Saccharomyces* que participam do processo de microvinificação representados no item 4.2.3.1 pela figura 20. Dados obtidos através dos resultados do sequenciamento da região ITS, utilizando os programas de bioinformática [115] para alinhar as sequencias, [116] para inferir um modelo de substituição nucleotídicas e [117] para inferir as relações evolutivas das sequencias. M_1: primeiro dia do processo; M_2: segundo dia do processo

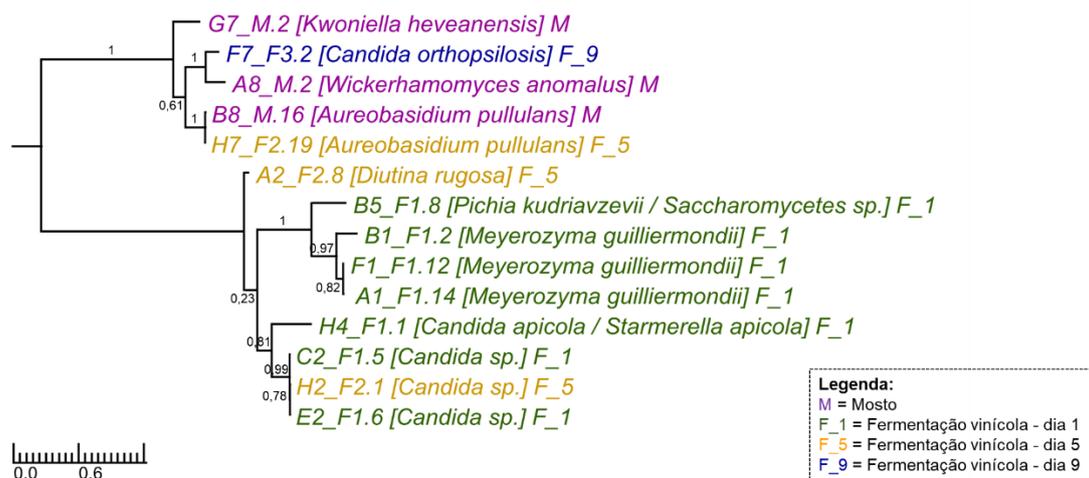


Figura 24: Árvore filogenética representando a relação evolutiva das leveduras não-*Saccharomyces* que participam do processo fermentativo de janeiro de 2020, representados no item 4.2.3.2 pela figura 21. Dados obtidos através dos resultados do sequenciamento da região ITS, utilizando os programas de bioinformática [115] para alinhar as sequências, [116] para inferir um modelo de substituição nucleotídicas e [117] para inferir as relações evolutivas das sequências. M: cepas de leveduras isoladas no mosto; F_1: cepas isoladas no primeiro dia do processo; F_5: cepas isoladas no quinto dia do processo; F_9: cepas isoladas no nono dia do processo.

4.2.4 Identificação das espécies de leveduras *Saccharomyces* nativas que participam do processo fermentativo

Todas as leveduras caracterizadas como possíveis *Saccharomyces* a partir da amplificação da região ITS, resultados apresentados no item 4.2.1 figura 16, foram submetidas a teste de genotipagem. Esta análise foi realizada com o intuito de distinguir as cepas de acordo ao padrão dos amplicons amplificados por PCR, como descrito no item 3.5.3.

Este método permitiu identificar 5 novas linhagens de leveduras *Saccharomyces* que estavam presentes ao longo como também no final do processo fermentativo realizado na vinícola nos anos de 2019-2020. Essas cepas mostraram através dos padrões dos amplicons serem diferentes das leveduras utilizadas como *starters* (cepas comerciais) no processo.

Realizamos o teste de genotipagem em 59 cepas de leveduras isoladas do processo fermentativo que foram identificadas como *Saccharomyces*. Algumas dessas cepas apresentaram o mesmo padrão de amplicons das cepas comerciais, o que já era esperado, uma vez que a prática de adubagem do solo com resíduo do processo fermentativo é aplicada por essa vinícola.

No entanto, outras cepas apresentaram padrões de amplicons diferente das cepas comerciais, porem idênticos entre si, sendo consideradas como espécies idênticas.

Temos como exemplo as cepas identificadas no processo fermentativo do ano de 2019, LBGAv-05 e LBGAv-08 as quais também foram isoladas no solo e no fruto respectivamente na colheita de junho de 2018. E também a cepa LBGAv-06 isolada no processo fermentativo do ano de 2020 que foi identificada também colonizando o fruto na colheita de junho de 2019.

Esse resultado indica que essas cepas são adaptadas as condições climáticas daquela região como também as condições do ambiente fermentativo se mantendo ativa até os últimos estágios do processo. Essas cepas nativas são grandes candidatas a serem protagonista do processo, por serem melhores adaptadas contribuirão para produção de um vinho que contenha características próprias propiciando uma identidade local ao vinho produzido. Na figura 25 podemos visualizar um exemplo dos padrões dos amplicons amplificados através dos iniciadores específicos utilizados na genotipagem.

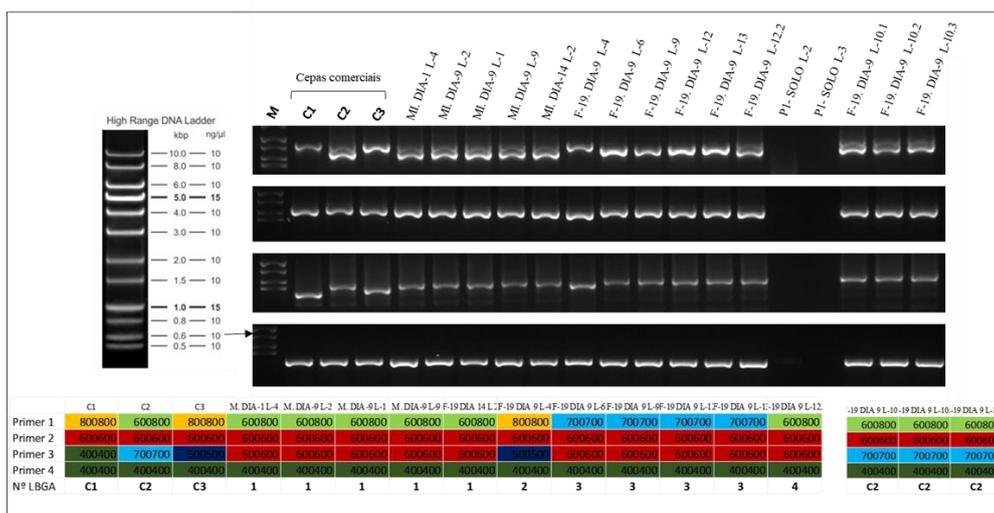


Figura 25: Caracterização molecular de linhagens isoladas do processo fermentativo da vinícola. Quatro regiões polimórficas dos genes *SPA2* (P1), *PYR3* (P2), *MNN4* (P3) e *EPL1* (P4), foram amplificadas seguindo o protocolo descrito por Carvalho Netto. C1: PDM; C2: BP-725 e C3: AWRI-796 leveduras comerciais utilizada na produção de vinho, LBGAv- 04, 05, leveduras *Saccharomyces* nativas isoladas na região vitivinícola.

4.2.5 Análise dos resultados

Durante o monitoramento do processo fermentativo verificamos que, leveduras não-*Saccharomyces* participam ativamente do processo. Essas cepas são isoladas em proporções superiores as *Saccharomyces* no início e permanecem até as últimas etapas do processo, figuras 16 e 17. Ao realizarmos análises mais abrangentes a fim de

identificar as espécies de não-*Saccharomyces* que participam do processo fermentativo, verificamos que, essas espécies diferem entre os dois processos monitorados.

Dentre as espécies de leveduras não-*Saccharomyces* identificadas estão algumas que contribuem para a qualidade sensorial do vinho, assim como outras são capazes de interferir negativamente. Quando comparados, os vinhos resultantes dos dois processos fermentativos, verificamos que eles apresentaram características organolépticas bem distintas, sugerindo uma interferência da microbiota de leveduras que participava desses processos, figuras 19, 20 e 21.

Outro aspecto que observamos foi que, quando analisamos a relação evolutiva entre as cepas de não-*Saccharomyces* isoladas no processo fermentativo novamente verificamos uma diversidade muito maior de espécies. Espécies que foram identificadas como idênticas pelos resultados obtidos do BLASTN, a topologia da árvore nos sugere que são diferentes, figuras 22, 23 e 24.

Durante o monitoramento do processo fermentativo isolamos também um total de 59 cepas de leveduras *Saccharomyces*. Ao analisa-las através do estudo de genotipagem, 5 delas mostraram através do perfil de amplicons apresentados serem diferentes entre si e também diferentes da cepa comercial, figura 25. Contudo, 3 dessas cepas de *Saccharomyces* isoladas durante o processo fermentativo apresentaram perfil de amplicons idênticos ao das *Saccharomyces* isoladas no solo e também no fruto. Esse resultado evidenciou que, as cepas de leveduras *Saccharomyces* isoladas no ambiente vitivinícola adentram o processo fermentativo e permanecem no mesmo até as últimas etapas do mesmo.

Portanto, durante as duas etapas desse estudo (Isolamento de leveduras do ambiente de produção do vinho e Isolamento e caracterização de leveduras ao longo do processo fermentativo da vinícola), isolamos um total de 5 cepas de leveduras *Saccharomyces* nativas. Partindo desses resultados realizamos análises para determinar a capacidade das cepas quanto a produção de vinhos, essas análises estão apresentadas na seção seguinte.

4.3 Caracterização tecnológica das espécies de leveduras *Saccharomyces* nativas isoladas

Para uma cepa de levedura ser considerada apropriada para produção de vinhos ele deve apresentar algumas características fisiológicas. Dentre essas características podemos destacar, capacidade de adaptar-se as condições do mosto de uva, possuir um

rápido início no processo fermentativo, ser tolerante a variadas concentrações de etanol, apresentar boa resposta aos diferentes tipos de estresse, produzir compostos oriundos do seu metabolismo que agregue qualidades ao produto final, entre outras.

No decorrer das duas etapas realizadas nesse estudo, isolamos 8 cepas de leveduras *Saccharomyces* nativas. Sendo, 5 cepas diferentes isoladas do processo fermentativo e 3 cepas que estava colonizando o fruto e o solo. No entanto, 3 dessas cepas isoladas no ambiente, mostraram através da análise de genotipagem ser iguais as cepas isoladas no processo fermentativo. Sendo assim, faremos as análises referente a caracterização de cada cepa quanto suas qualidades tecnológicas em somente 5 cepas de *Saccharomyces* nativa isoladas

Com o propósito de selecionar, dentro das cepas identificadas como *Saccharomyces*, a cepa que apresente melhor desempenho para conduzir o processo de produção de vinhos. Submetemos as diferentes cepas de *Saccharomyces* isoladas a testes que determinaram sua capacidade de conduzir e se manter viável ao longo do processo fermentativo. Dentre os testes realizados estão: capacidade de crescimento em mosto de uva, crescimento em meio contendo metabissulfito de potássio, produção de sulfeto de hidrogênio, tolerância a variadas concentrações de etanol e açúcares.

As análises realizadas com seus respectivos resultados serão apresentadas separadamente a seguir.

4.3.1 Análise de crescimento mosto de uva Syrah

Se adaptar ao ambiente fermentativo é uma das características essenciais que uma levedura deve apresentar para ser inserida no processo de produção de vinhos. Devido as variações de pH e outros componentes do mosto, algumas leveduras podem não ser capazes de ultrapassar os primeiros estágios do processo.

Para verificar a capacidade de adaptação ao mosto realizamos uma análise de crescimento em mosto de uva Syrah com o valor inicial de 22°BX, por 8 horas, metodologia descrita no item 3.6.

O desenvolvimento das cepas isoladas foi analisado e comparados ao das cepas comerciais utilizadas pela vinícola.

Verificamos o desempenho das cepas a cada ciclo celular através da densidade óptica de 600nm. Todas as cepas analisadas apresentaram uma boa adaptação ao mosto se mantendo em crescimento exponencial durante todo período em que a análise foi realizada, dados demonstrados pela figura 26.

Após as análises de crescimento em mosto, realizamos diluições seriadas de cada cepa, e através de *dropout* cultivamos 5µl das mesmas em placas de mosto sólido para verificar a viabilidade celular em até 48 horas.

De acordo com os dados apresentados pela figura 27, mesmo após a análise de crescimento em mosto líquido as cepas quando cultivadas em mosto sólido apresentam um ótimo desempenho. Quando comparamos as cepas de leveduras *Saccharomyces* isoladas na vinícola às cepas comerciais, notamos que as cepas nativas apresentam desempenho superior às cepas comerciais, em exceção da cepa LBGAv-08, que mesmo após 48 horas de cultivo pode-se observar o desempenho comprometido.

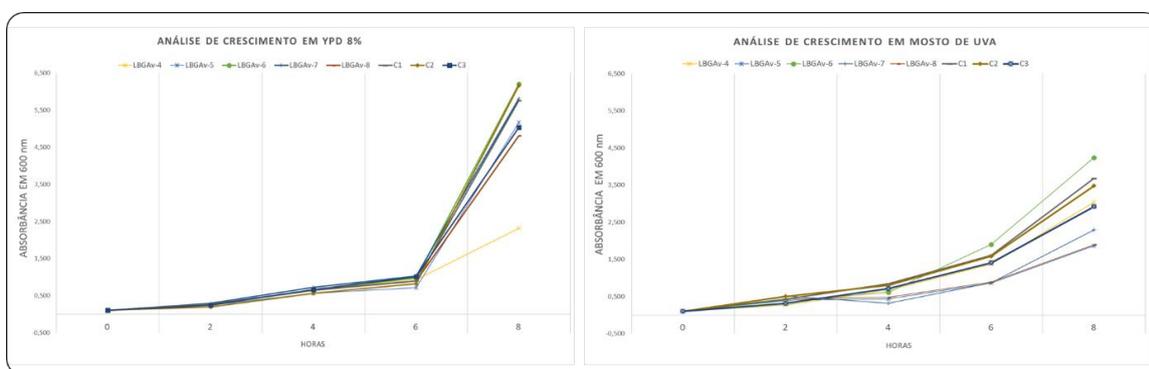


Figura 26: Análise de crescimento em mosto de uva syrah C1: PDM; C2: BP-725 e C3: AWRI-796 leveduras comerciais utilizada na produção de vinho, LBGAv- 04, 05, 06, 07, 08 leveduras *Saccharomyces* nativas isoladas na região vitivinícola.

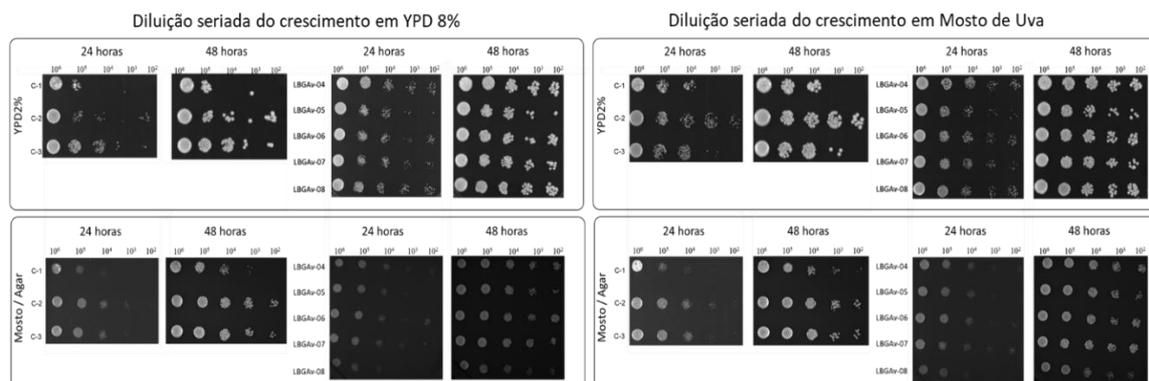


Figura 27: Análise de crescimento em mosto de uva syrah acrescido de ágar, C1: PDM; C2: BP-725 e C3: AWRI-796 leveduras comerciais utilizada na produção de vinho, LBGAv-04, LBGAv- 05, LBGAv- 06, LBGAv- 07, LBGAv- 08 leveduras *Saccharomyces* nativas isoladas na região vitivinícola. Painel superior cepas cultivadas em meio sólido YPD2%, painel inferior cepas cultivadas em mosto acrescido de ágar.

4.3.2 Análise de crescimento em diferentes concentrações de Metabissulfito de Potássio

Metabissulfito de Potássio é um composto utilizado no mosto de uva antes do inóculo da cepa comercial. Sua utilização tem como objetivo eliminar os microrganismos presentes no mosto para um melhor controle do processo fermentativo. Uma cepa de levedura para ser considerada apropriada para conduzir a fermentação deve ser resistente as variadas concentrações deste composto.

Para validar essa característica as cepas de *Saccharomyces* nativas isoladas foram submetidas quanto a capacidade de crescer em meio contendo o composto metabissulfito de potássio nas concentrações de 0,1 g/L, 0,2 g/L, 0,4 g/L e 0,8 g/L, de acordo com a metodologia descrita no item 3.7.

Baseados no perfil de crescimento das cepas comerciais C1:PDM; C2: BP-725, C3: AWRI-796 e da cepa haploide BY-4742, comparamos o desempenho das cepas isoladas sob estas diferentes condições.

Todas as cepas foram ajustadas para uma concentração celular inicial de 0,1 D.O 600nm em 20 ml. As linhagens analisadas foram cultivadas em tubos com diferentes concentrações de metabissulfito de potássio na temperatura de 30°C, onde por densidade óptica de 600nm analisamos cada ciclo celular por um período de oito horas.

Durante a análise foi possível observar que as cepas de leveduras *Saccharomyces* isoladas na vinícola apresentaram uma ótima adaptação as diferentes concentrações de metabissulfito de potássio em comparação as cepas comerciais. Sendo que, a cepa BY-4742 e PDM (C1) apresentaram desempenho inadequado em todas as análises.

Contudo, nas análises realizadas na concentração de 0,8 g/L de metabissulfito, foi percebido que o desempenho tanto das cepas comerciais quanto das cepas isoladas foi comprometido. Resultado observado através do crescimento truncado que as cepas apresentaram.

A figura 28 demonstra o perfil de crescimento das cepas em meio YPD 8% sem adição de metabissulfito de potássio e também das diferentes concentrações de Metabissulfito de potássio utilizadas nesta análise.

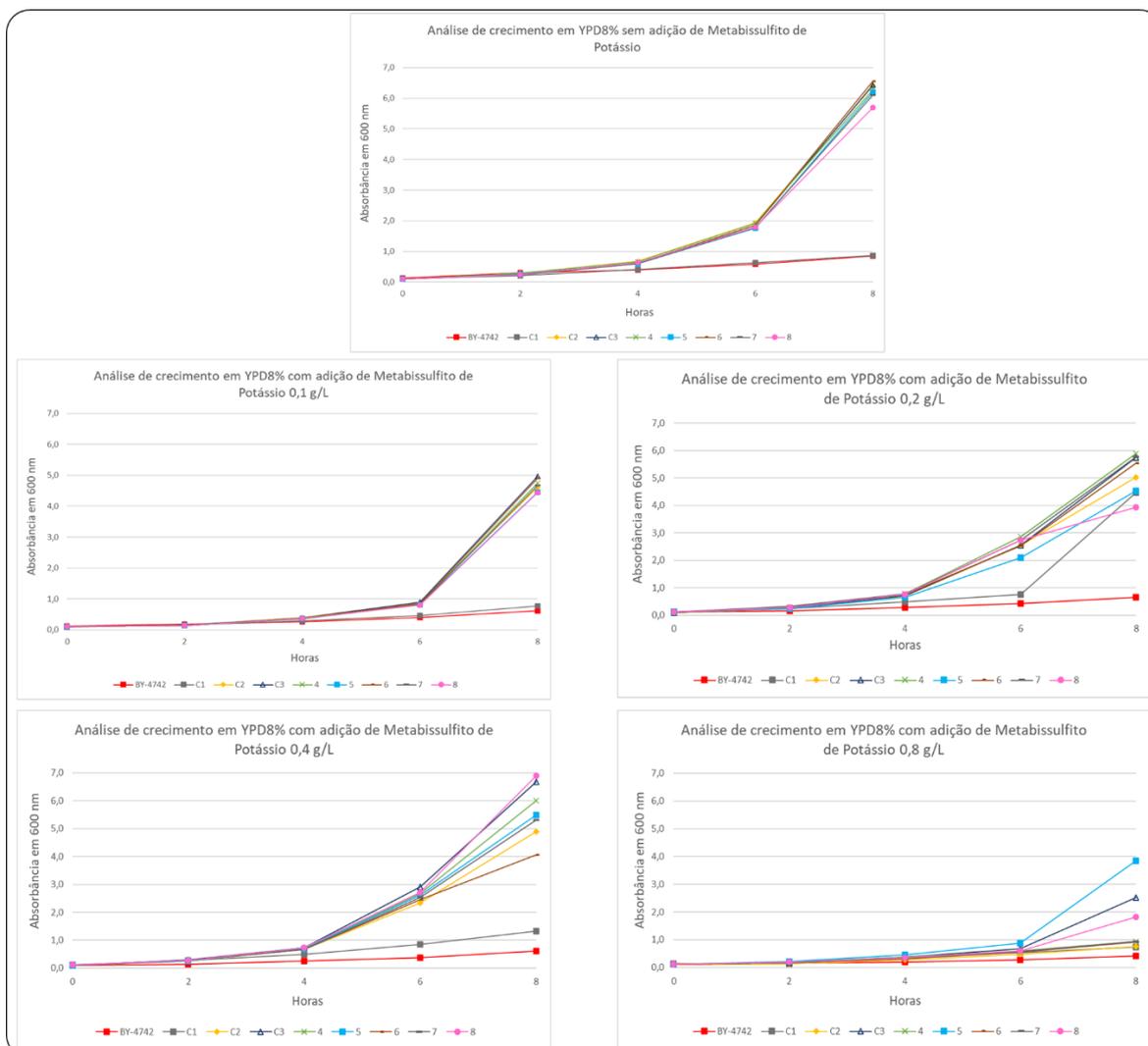


Figura 28: Gráficos representativos do desempenho de crescimento das leveduras em diferentes concentrações de Metabissulfito de Potássio, C1: PDM; C2: BP-725 e C3: AWRI-796 leveduras comerciais utilizada na produção de vinho, BY-4742: cepa de *Saccharomyces* nativa haploide, LBGAv-04, LBGAv-05, LBGAv-06, LBGAv-07, LBGAv-08 leveduras *Saccharomyces* nativas isoladas na região vitivinícola.

Após submettermos as cepas ao crescimento em meio líquido YPD 8% acrescido das diferentes concentrações de metabissulfito de potássio, realizamos uma diluição seriada dos diferentes cultivos 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2 , cultivando 5 μ l de cada diluição em placa com meio sólido YPD 2%, onde a viabilidade das cepas foi analisada em relação aos controles por 24 horas. A figura 29 apresenta a viabilidade das cepas após o cultivo nas diferentes concentrações de metabissulfito, quando posteriormente cultivadas em meio sólido de YPD 2% por 24 horas.

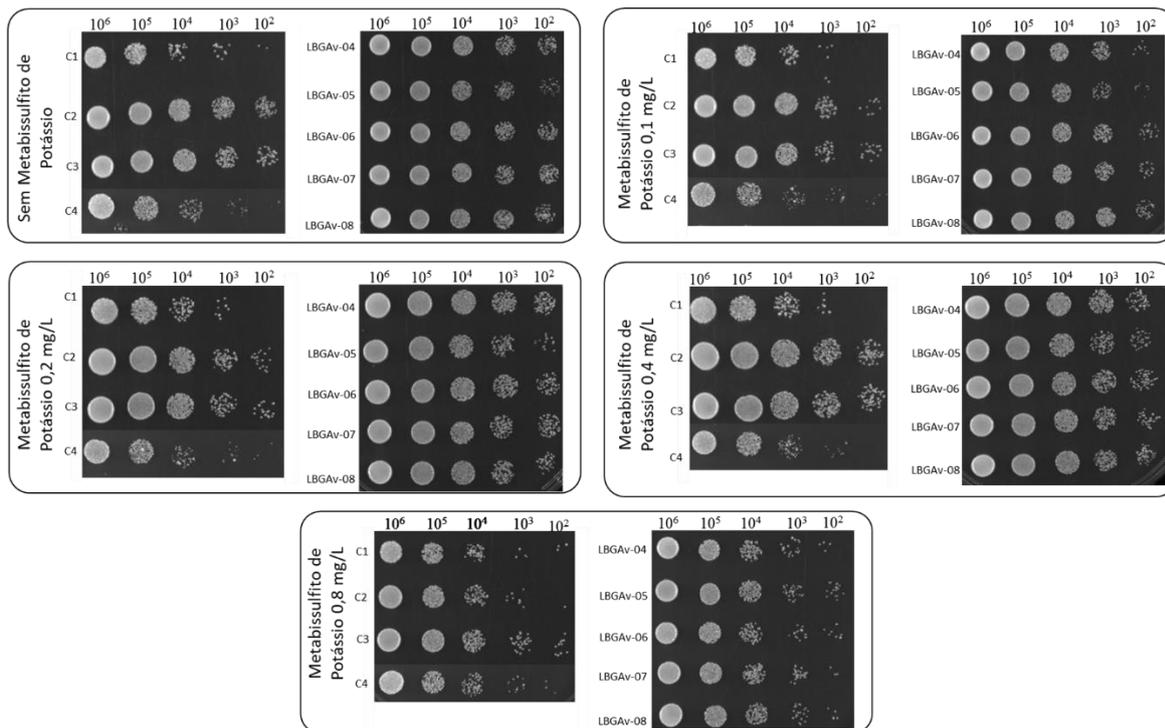


Figura 29: Análise de crescimento das leveduras após serem submetidas ao crescimento em diferentes concentrações de Metabissulfito de Potássio, C1: PDM; C2: BP-725 e C3: AWRI-796 leveduras comerciais utilizada na produção de vinho, BY-4742: cepa de *Saccharomyces* nativa haploide, LBGAv-04, LBGAv-05, LBGAv-06, LBGAv-07, LBGAv-08 leveduras *Saccharomyces* nativas isoladas na região vitivinícola.

Essa análise demonstrou que as cepas nativas isoladas são capazes de se manterem ativas nas concentrações de metabissulfito de potássio acima do comumente utilizado no processo de vinificação nessa vinícola, que fica entre 0,1-0,2 g/l. Observamos também que mesmo após passar por esse estresse as células se mantem viáveis, até mesmo quando submetidas às concentrações que prejudicaram seu desempenho. Como podemos observar na concentração de 0,8 g/l de metabissulfito, concentração em que as cepas nativas apresentaram desempenho superior ao das cepas comerciais.

Esse resultado evidencia que as cepas de *Saccharomyces* nativas provavelmente possuem característica de maior de resistência a esse composto.

4.3.3 Seleção das linhagens não produtora de Sulfeto de Hidrogênio

Para identificar as cepas de leveduras *Saccharomyces* isoladas não produtoras do gás sulfeto de hidrogênio utilizamos a técnica descrita no item 3.8. Leveduras que produzem esse gás não são adequadas ao processo fermentativo pois esse gás é responsável por agregar ao produto final odor e sabores desagradáveis.

A produção deste gás é identificada através da coloração marrom enegrecida que as respectivas cepas apresentam. Essa coloração acontece devido a reação que ocorre

entre o sulfeto de chumbo presente no meio e o H₂S produzido pelas cepas. Esse exemplo de reação pode ser observado na coloração apresentada pela cepa de levedura não-*Saccharomyces* utilizada como controle positivo (cepa produtora). Já as cepas isoladas e as cepas comerciais apresentaram coloração branca, esse resultado indica que não produzem H₂S, resultados apresentados na figura 30.

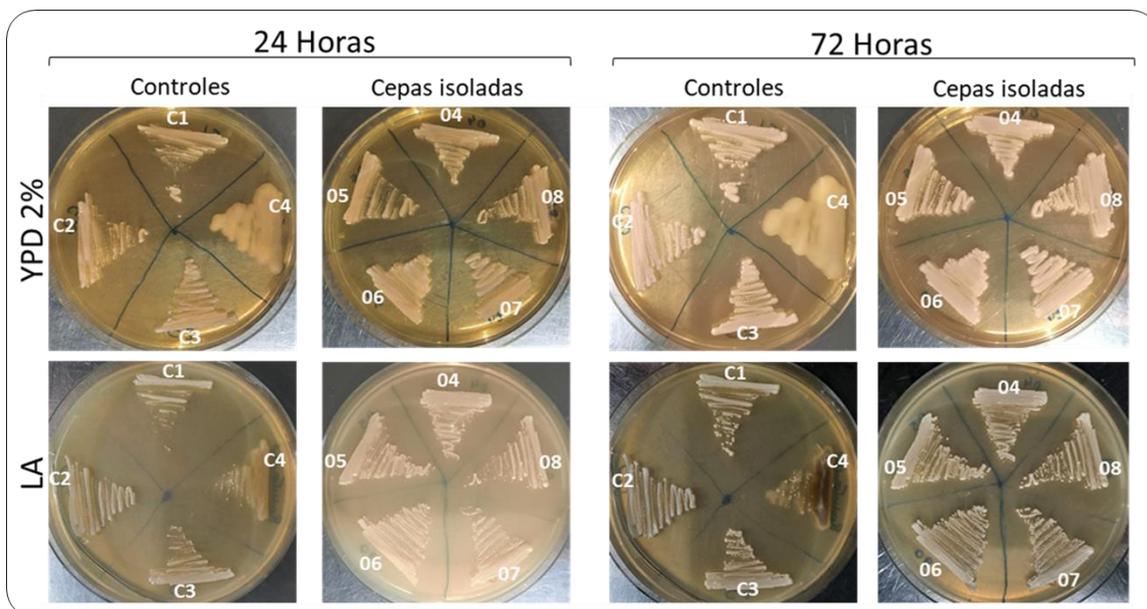


Figura 30: Verificação das cepas produtoras de Sulfeto de Hidrogênio utilizando meio sólido LA. Cepas: C1: PDM; C2: BP-725 e C3: AWRI-796 leveduras comerciais utilizadas na produção de vinho utilizadas como controle negativo. C4: cepa de levedura não-*Saccharomyces* isolada no ambiente vitivinícola produtora de Sulfeto de Hidrogênio. Cepas: LBGAv-04: LBGAv-5; LBGAv-06; LBGAv-07 e LBGAv-08: cepas de leveduras *Saccharomyces* nativas isoladas.

4.3.4 Seleção das linhagens resistentes a etanol

Apesar de *Saccharomyces cerevisiae* conseguir metabolizar etanol para produção de energia, à medida que o processo fermentativo evolui esse aumento nas concentrações de etanol passa a ser tóxico, ocasionando o declínio da viabilidade celular.

O etanol é o principal produto originado da fermentação e ele é essencial para a característica do vinho. Por esse motivo uma levedura para ser efetiva no processo fermentativo deve apresentar resistência as variadas concentrações de etanol dentre outras características tecnológicas.

Utilizando a metodologia descrita no item 3.9, verificamos a tolerância das cepas isoladas as diferentes concentrações de etanol (10%, 12% e 14%) e comparamos seu perfil ao das cepas comerciais utilizadas na produção de vinho.

Quando cultivadas em meio líquido (YPD) com a concentração de etanol de 12% e 14% as cepas de leveduras *Saccharomyces* isoladas não apresentaram viabilidade

celular resultado também observado nas cepas comerciais. No entanto quando cultivadas em meio com a concentração de etanol de 10% todas as cepas se mantiveram viáveis. Sendo que as cepas LBGAv-04, LBGAv-05 e LBGAv-06 apresentaram desempenho superior ao das demais cepas e também das cepas comerciais.

Resultado já era esperado, pois as cepas comerciais são caracterizadas por apresentarem tolerância a etanol que alcança o limiar de 12-15% (v/v), valores aceitáveis para o vinho.

A figura 31 demonstra o crescimento em meio sólido (YPD) onde a viabilidade das cepas foi verificada 24 horas após serem cultivadas em meio líquido (YPD) na concentração de etanol 10%, e também na condição controle (sem etanol). As demais concentrações não apresentaram viabilidade motivo pelo qual não estão representadas na figura.

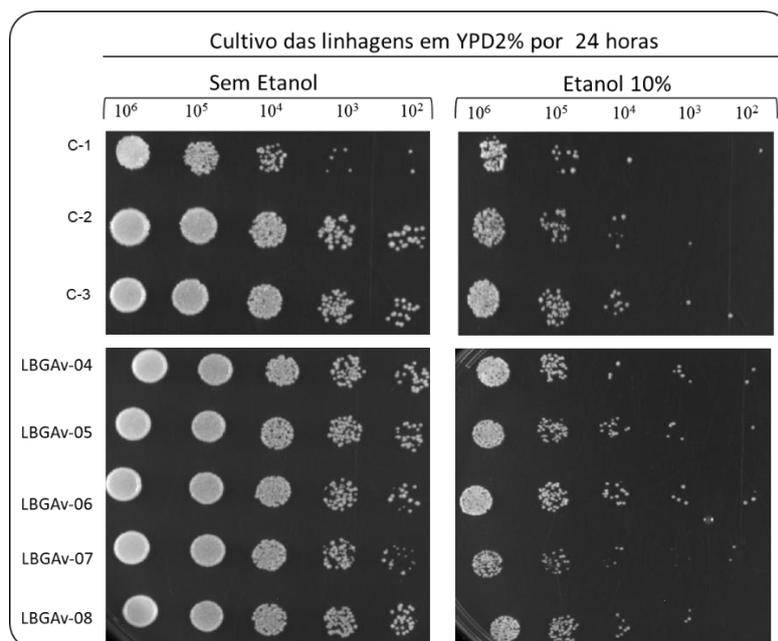


Figura 31: Análise da viabilidade das cepas após serem submetidas ao estresse de etanol. Cepas C1: PDM; C2: BP-725 e C3: AWRI-796 leveduras comerciais utilizada na produção de vinho LBGAv-04: LBGAv-05; LBGAv-06; LBGAv-07 e LBGAv-08: cepas de leveduras *Saccharomyces* nativas isoladas.

4.3.5 Seleção das linhagens osmotorelantes

O teor de açúcares da uva pode variar entre 15 a 30%, esses valores podem ser influenciados por diferentes fatores, como o grau de maturação das uvas, o clima, o solo e da variedade de uva utilizada.

Durante o processo fermentativo as leveduras tem que crescer e se desenvolver sob altas concentrações de açúcares, e quando colocadas em condições hiperosmóticas as

células podem parar de crescer reduzindo então os processos celulares. Para se adaptar a condição ocorre uma série de eventos, onde são ativados genes responsáveis por remodelar a resposta adaptativa [128]. Para ocorrer essa resposta requer tempo o que em um processo fermentativo pode ser desastroso, pois uma fermentação lenta ou parada gera prejuízo e má qualidade do produto final.

Contudo, com o objetivo de selecionar cepas de leveduras que apresente uma boa resposta adaptativa as variadas concentrações de glicose, utilizamos a metodologia descrita no item 3.9.

As cepas foram cultivadas em meio YP líquido contendo as concentrações de glicose de 20%, 25%, 30% e 35%, as cultivamos também em uma condição controle (YPD 2%) durante 8 horas. Através de densidade óptica de 600nm, verificamos o seu crescimento a cada ciclo celular e as comparamos ao perfil apresentado pelas cepas comerciais.

Quando comparadas, as cepas isoladas demonstram o mesmo desempenho do apresentado pelas cepas comerciais. Contudo, notamos que essas cepas quando cultivadas em concentrações de glicose acima de 25%, elas apresentam baixo desempenho, característica também observada nas cepas comerciais. Porém essa característica não é prejudicial, uma vez que o mosto de uva atinge uma concentração inicial de açúcares abaixo desse valor. Na figura 32 podemos observar o perfil de crescimento das cepas quando cultivadas nas diferentes concentrações de glicose.

Logo após o cultivo em meio líquido com as respectivas concentrações de glicose, através da técnica de *dropout* em placas de petri com YPD 2% cultivadas em 30°C por 24 horas, analisamos também a viabilidade de cada cepa.

Verificamos que, de acordo com o resultado apresentado pela figura 33, mesmo nas concentrações acima de 25% as quais as cepas não apresentaram bom desempenho, nas análises realizadas em meio líquido, ao serem cultivadas após esse estresse as células apresentaram viabilidade celular.

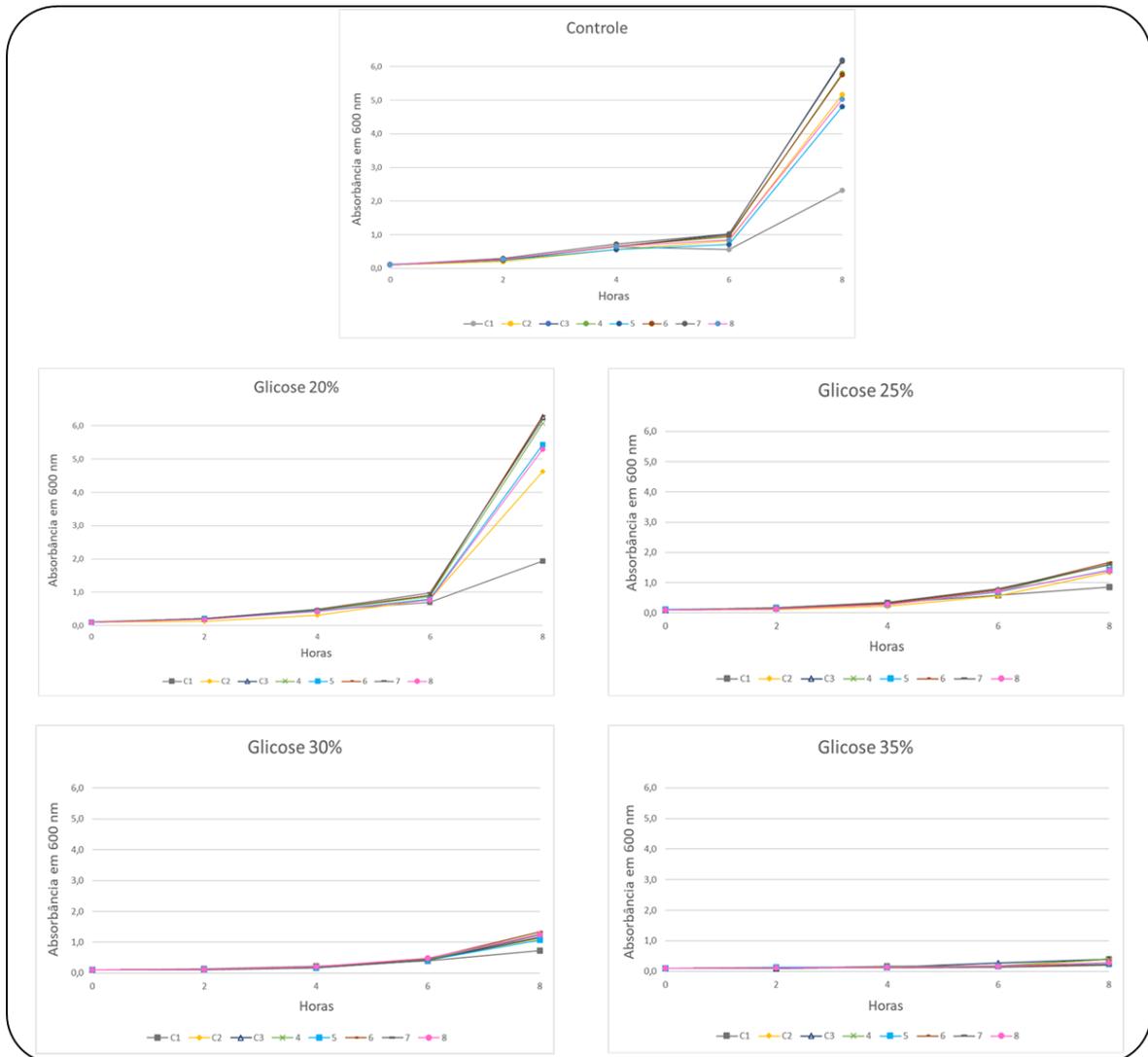


Figura 32: Verificação das cepas resistentes a glicose nas concentrações de 20%, 25%, 30% e 35%. Cepas C1: PDM; C2: BP-725 e C3: AWRI-796 leveduras comerciais utilizada na produção de vinho. Cepas: LBGAv-04; LBGAv-05; LBGAv-06; LBGAv-07 e LBGAv-08: cepas de leveduras *Saccharomyces* nativas isoladas.

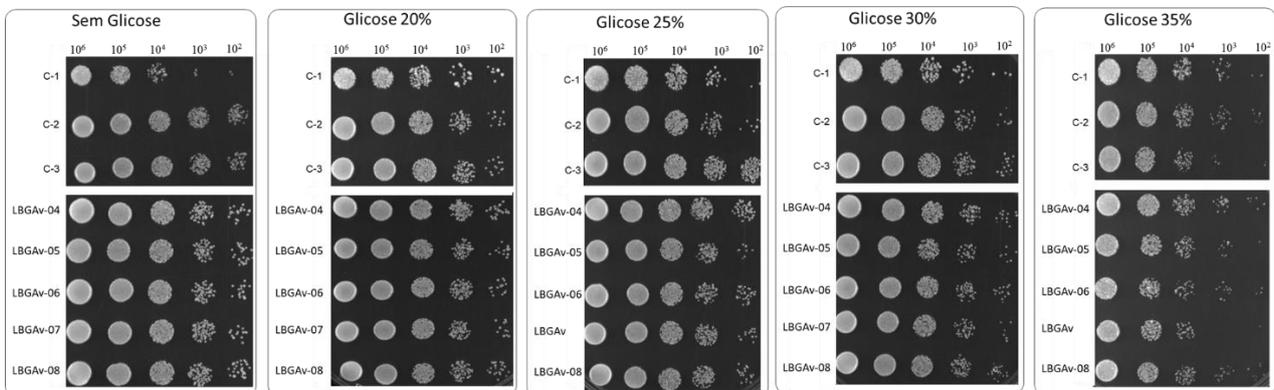


Figura 33: Verificação das cepas resistentes a glicose nas concentrações de 20%, 25%, 30% e 35%. Cepas C1: PDM; C2: BP-725 e C3: AWRI-796 leveduras comerciais utilizada na produção de vinho. Cepas: LBGAv-04; LBGAv-05; LBGAv-06; LBGAv-07 e LBGAv-08: cepas de leveduras *Saccharomyces* nativas isoladas.

4.3.6 Seleção das linhagens termotolerantes

A temperatura é um fator muito importante, ela influencia no crescimento e também no desenvolvimento dos microrganismos. Temperaturas baixas reduzem os processos vitais da célula e temperaturas elevadas podem provocar a desnaturação de proteínas interferindo na cinética dos processos intracelulares afetando o vinho produzido.

A temperatura ótima para produção de vinhos pode variar de 12°C à 30°C dependendo do vinho que será produzido. Na vinícola onde o presente trabalho foi desenvolvido o processo fermentativo ocorre na temperatura de 25°C a 28°C.

Portanto visando identificar dentro das leveduras nativas isoladas, uma cepa que se adapte dentro da faixa de temperatura utilizada para vinificação, cultivamos as diferentes cepas nas temperaturas de 18°C, 20°C, 25°C, 30°C e 35°C, seguindo a metodologia descrita no item 3.11, onde analisamos seu crescimento em relação às cepas comerciais.

De acordo com os dados apresentados pela figura 34 verificamos que as cepas de leveduras *Saccharomyces* isoladas apresentam o mesmo padrão de crescimento que o apresentado pelas cepas comerciais. Isto é, em temperaturas inferiores à 25°C seu desempenho é comprometido, já em temperaturas de 25°C até 35°C essas cepas de leveduras demonstram ótimo crescimento.

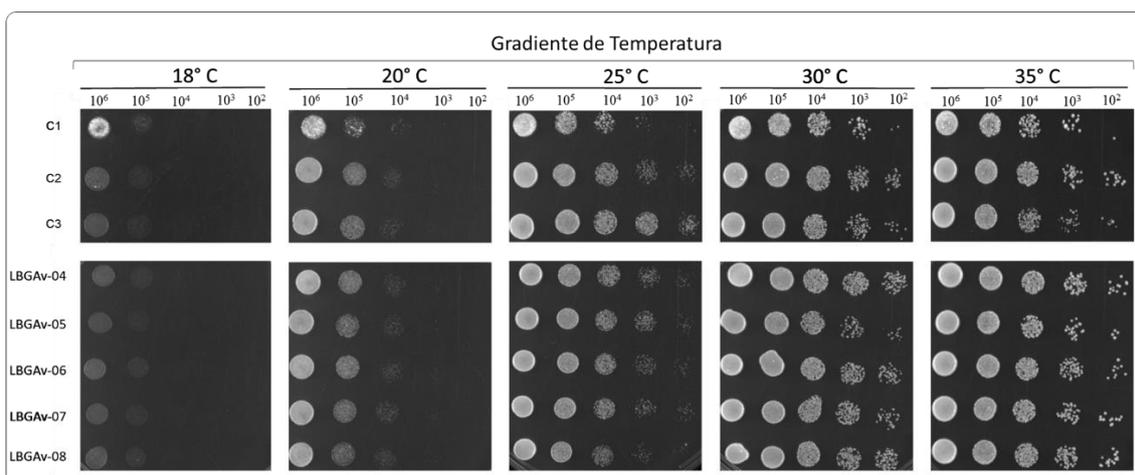


Figura 34: Identificação das leveduras termotolerante. Cepas C1: PDM; C2: BP-725 e C3: AWRI-796 leveduras comerciais utilizada na produção de vinho. Cepas: LBGAv-04; LBGAv-05; LBGAv-06; LBGAv-07 e LBGAv-08: cepas de leveduras *Saccharomyces* nativas isoladas.

4.4 Análise dos resultados

Neste estudo, analisamos a microbiota de leveduras que coloniza o ambiente vitivinícola como também a microbiota que participa do processo fermentativo. Para isso, realizamos um acompanhamento da vinícola por três safras consecutivas onde coletamos amostras de todo ambiente vitivinícola assim como monitoramos dois processos fermentativos.

De acordo com a literatura, diferentes microrganismos colonizam o ambiente vitivinícola [10; 22; 23], e leveduras *Saccharomyces* predominam o processo fermentativo desde os primeiros instantes [129; 130].

Em nosso estudo concluímos que, no ambiente vitivinícola existem cepas de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* nativas que colonizam diferentes tecidos da planta como também o solo. E que essas cepas de leveduras também participam ativamente do processo fermentativo, sendo que, no início deste processo predomina-se espécies de não-*Saccharomyces*. Conforme o processo fermentativo evolui essas espécies então são gradativamente substituídas pelas *Saccharomyces*.

As análises realizadas indicam que, de alguma maneira essas espécies contribuem para realização do processo e interferem diretamente na qualidade do vinho produzido. Como foi observado, na característica organoléptica do vinho resultante dos dois processos fermentativos analisados. Nesses processos de vinificação a microbiota de leveduras que predominavam cada etapa eram distintas, resultados apresentados no item 4.2.3.1 e 4.2.3.2.

Mais ainda, no final deste processo encontramos cepas de leveduras *Saccharomyces* diferentes do inóculo inicial (cepas comerciais).

Isolamos um total de 347 cepas de leveduras não-*Saccharomyces* que foram submetidas ao sequenciamento da região ITS a fim de identificar os diferentes gêneros. Dentre os gêneros identificados estão cepas que contribuem para o *terroir* do vinho como exemplo: *Meyerozyma guilliermondii* que contribui para a riqueza da cor do vinho e espécies de *Pichia* que possui a capacidade de produzir compostos que elevam o aroma frutado do vinho. Assim como identificamos também espécies de *Candida* que são prejudiciais pois são grandes produtoras de compostos que interferem na qualidade sensorial do vinho.

Identificamos também 5 cepas de leveduras *Saccharomyces* nativas, essas cepas foram investigadas através de estudos de genotipagem e apresentaram padrões genéticos diferente das cepas comerciais e algumas dessas cepas eram compatíveis aos padrões das

cepas isoladas no solo e no fruto. Com isso construímos um banco de leveduras com 23 espécies diferentes de leveduras não-*Saccharomyces* e 5 *Saccharomyces*.

Todas as *Saccharomyces* nativas também foram analisadas em testes fisiológicos que verificaram sua capacidade de produzir vinhos.

Nesses testes as cepas LBGAv-05, 06 e 08 apresentaram o desempenho superior ao das cepas comerciais utilizadas para produção de vinhos. Resultado que foi observado em especial nas análises de resistência ao composto metabissulfito de potássio, na capacidade de adaptação ao mosto de uva. Esses resultados indicam que essas cepas são melhores adaptadas à essas condições o que favoreceria sua utilização no processo de vinificação

Estes resultados abrem margem para análises mais profundas quanto as contribuições de cada cepa durante o processo. Para assim determinar o uso destas leveduras nativas isoladamente ou em conjunto (mix de leveduras) permitindo um maior controle da fermentação, proporcionando uma reprodutibilidade do vinho produzido e ainda agregando ao vinho características organolépticas únicas que contribui para o *Terroir* local [8].

Todas as linhagens isoladas do vinhedo e dos processos fermentativos analisados encontram-se armazenadas em um banco de leveduras no laboratório de bioquímica e genética aplicada (LBGA).

5 CONCLUSÃO

- Isolamos e identificamos 5 cepas de leveduras *Saccharomyces* e 347 não-*Saccharomyces* nativas da região produtora de vinhos.
- Os resultados mostram uma pequena diversidade de leveduras *Saccharomyces* e uma ampla diversidade de leveduras não-*Saccharomyces* que colonizam o ambiente vitivinícola.
- Foram identificadas 5 novas linhagens de leveduras *Saccharomyces* nativas e distintas das aplicadas industrialmente.
- As linhagens identificadas foram analisadas quanto: a capacidade de desenvolvimento em mosto de uva, a característica de resistência a

metabissulfito de potássio, a etanol e a glicose, produção de sulfeto de hidrogênio e também verificamos a faixa ótima de temperatura de cada cepa. Em todas as análises as cepas de *Saccharomyces* nativas apresentaram desempenho igual ou superior ao das leveduras comerciais utilizadas na vinificação.

- Estas linhagens apresentam grande potencial de aplicação como *starters* no processo de produção industrial de vinhos contribuindo para a elaboração de vinhos típicos da região produtora.

6 RELEVÂNCIA DO TRABALHO E PERSPECTIVAS FUTURAS

O setor vitivinícola brasileiro encontra-se em grande expansão e análises específicas sobre o ambiente vitivinícola como também, sobre a dinâmica do processo fermentativo são de grande importância para propiciar a produção de vinhos que apresentem maior competitividade neste mercado.

No entanto, no Brasil estudos mais abrangentes sobre a produção de vinhos ainda é a minoria. O desenvolvimento do presente trabalho foi importante pois ele demonstrou que o Brasil apresenta condições para produzir vinhos diversificados e que preservem a tipicidade da região produtora. Com sua conclusão constatamos que o ambiente vitivinícola é colonizado por uma grande diversidade de leveduras não-*Saccharomyces* que são capazes de contribuir para o *terroir* local.

Além disso, identificamos cepas de leveduras *Saccharomyces* nativas que demonstraram ser melhores adaptadas ao processo fermentativo realizado pela vinícola, o que favorece sua aplicação para produção de vinhos. O que seria um grande avanço, pois o Brasil depende de cepas de leveduras importadas para produzir vinhos brasileiros.

Esses resultados abrem margem para realizar uma análise mais abrangente quanto a capacidade fermentativa que cada cepa de leveduras *Saccharomyces* nativa isolada na vinícola Terrassos apresenta. Análises de genoma e de transcriptoma poderão ser realizados visando comparar e compreender os genes envolvidos no processo fermentativo e a produção de compostos relacionados as características organolépticas do vinho. Tendo resultados satisfatório, essas cepas de *Saccharomyces* nativas serão testadas na produção de vinhos em escala piloto na vinícola onde o presente projeto foi realizado e posteriormente introduzidas na escala industrial.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 CLUB, G. M. W. When was wine first discovered? , Disponível em: < <https://www.goldmedalwineclub.com/blog/post/when-was-wine-first-discovered-206> >. Acesso em: 30/01/2022.
- 2 MCGOVERN, P. et al. Early Neolithic wine of Georgia in the South Caucasus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 48, p. E10309, 2017. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/114/48/E10309.abstract> >.
- 3 BISSON, L. F. et al. The present and future of the international wine industry. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 696-9, Aug 8 2002. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12167877> >.
- 4 AMERINE, M. A.; INDUSTRIAL, A. C. S. D. O.; CHEMISTRY, E. **Wine Production Technology in the United States: A Symposium**. American Chemical Society, 1981. ISBN 9780841205963. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=zXLxAAAAMAAJ> >.
- 5 EL DAROV, M. A. et al. Genomics and Biochemistry of *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast Strains. **Biochemistry (Mosc)**, v. 81, n. 13, p. 1650-1668, Dec 2016. ISSN 1608-3040 (Electronic) 0006-2979 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28260488> >.
- 6 VAN WYK, N. et al. The Whiff of Wine Yeast Innovation: Strategies for Enhancing Aroma Production by Yeast during Wine Fermentation. **J Agric Food Chem**, v. 67, n. 49, p. 13496-13505, Dec 11 2019. ISSN 1520-5118 (Electronic) 0021-8561 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31724402> >.
- 7 BELDA, I. et al. Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. **Molecules**, v. 22, n. 2, Jan 24 2017. ISSN 1420-3049 (Electronic) 1420-3049 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28125039> >.
- 8 CALLEJON, R. M. et al. Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Anal Chim Acta**, v. 660, n. 1-2, p. 68-75, Feb 15 2010. ISSN 1873-4324 (Electronic) 0003-2670 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20103145> >.
- 9 CAPOZZI, V. et al. Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. **Microbiol Res**, v. 181, p. 75-83, Dec 2015. ISSN 1618-0623 (Electronic) 0944-5013 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26521127> >.
- 10 BOKULICH, N. A. et al. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 1, p. E139-

- 48, Jan 7 2014. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24277822> >.
- 11 ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food Microbiology**. RSC Publishing, 2008. ISBN 9780854042845. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=g4zkCkoQRQ0C> >.
- 12 MORATA, A. et al. Contribution of Non-Saccharomyces Yeasts to Wine Freshness. A Review. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, p. 34, 2020. ISSN 2218-273X. Disponível em: < <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/1/34> >.
- 13 COMITINI, F. et al. New insights on the use of wine yeasts. **Current Opinion in Food Science**, v. 13, p. 44-49, 2017/02/01/ 2017. ISSN 2214-7993. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799317300231> >.
- 14 BELDA, I. et al. From Vineyard Soil to Wine Fermentation: Microbiome Approximations to Explain the "terroir" Concept. **Front Microbiol**, v. 8, p. 821, 2017. ISSN 1664-302X (Print) 1664-302X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28533770> >.
- 15 CIANI, M.; COMITINI, F. Non-Saccharomyces wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. **Annals of Microbiology**, v. 61, p. 25-32, 03/01 2011.
- 16 FISCHER, U. Wine Aroma. In: BERGER, R. G. (Ed.). **Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007. p.241-267. ISBN 978-3-540-49339-6.
- 17 SWIEGERS, J. H. et al. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 11, n. 2, p. 139-173, 2005. ISSN 1322-7130. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x> >.
- 18 KNIGHT, S. et al. Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: evidence for a microbial aspect to terroir. **Sci Rep**, v. 5, p. 14233, Sep 24 2015. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26400688> >.
- 19 DIVOL, B.; DU TOIT, M.; DUCKITT, E. Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 95, n. 3, p. 601-13, Aug 2012. ISSN 0175-7598.
- 20 HARADA, K.; HIGUCHI, R.; UTSUMI, I. On the Remarkable Inhibition of Baker's Yeast Respiration with Co-existence of Sorbic Acid and Thiamine or Its Derivative. **THE JOURNAL OF VITAMINOLOGY**, v. 15, n. 3, p. 271-277, 1969.
- 21 FAVERO, D. M.; RIBEIRO, C. D. S. G.; AQUINO, A. D. D. Sulfitos: importância na indústria alimentícia e seus possíveis malefícios à população. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 1, p. 11-20, 02/09 2015.

- Disponível em: <
<https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/san/article/view/8634684> >
 Acesso em: 2021/04/13.
- 22 CASTAÑEDA, L. E.; BARBOSA, O. Metagenomic analysis exploring taxonomic and functional diversity of soil microbial communities in Chilean vineyards and surrounding native forests. **PeerJ**, v. 5, p. e3098, 2017. ISSN 2167-8359 (Print) 2167-8359.
- 23 COLLER, E.; CESTARO, A. Microbiome of vineyard soils is shaped by geography and management. v. 7, n. 1, p. 140, Nov 8 2019. ISSN 2049-2618.
- 24 CIANI, M.; COMITINI, F. Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 1-6, 2015/02/01/ 2015. ISSN 2214-7993. Disponível em: <
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799314000034> >.
- 25 PADILLA, B.; GIL, J. V.; MANZANARES, P. Past and Future of Non-Saccharomyces Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. **Front Microbiol**, v. 7, p. 411, 2016. ISSN 1664-302X (Print) 1664-302X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27065975> >.
- 26 SABATE, J. et al. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. **Microbiological Research**, v. 157, n. 4, p. 267-274, 2002/01/01/ 2002. ISSN 0944-5013. Disponível em: <
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501304700865> >.
- 27 BENITO, Á.; CALDERÓN, F.; BENITO, S. The Influence of Non-Saccharomyces Species on Wine Fermentation Quality Parameters. **Fermentation**, v. 5, n. 3, p. 54, 2019. ISSN 2311-5637. Disponível em: <
<https://www.mdpi.com/2311-5637/5/3/54> >.
- 28 CAPECE, A. et al. Diversity of Saccharomyces cerevisiae Strains Isolated from Two Italian Wine-Producing Regions. **Front Microbiol**, v. 7, p. 1018, 2016. ISSN 1664-302X (Print) 1664-302X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27446054> >.
- 29 PATARO, C. G., F. C. O.; ARAÚJO, R. A. C.; ROSA, C. A.; SCHWAN, R. F.; CAMPOS, C. R.; CLARET, A. S.; CASTRO, H. A. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. **Informe Agropecuário**, v. 23, n. 217, p. 37-43, 2002.
- 30 GUIMARÃES, T. M. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura saccharomyces cerevisiae para elaboração de vinho**. 2005. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- 31 GAROFALO, C. et al. Selection of indigenous yeast strains for the production of sparkling wines from native Apulian grape varieties. **Int J Food Microbiol**, v.

- 285, p. 7-17, Nov 20 2018. ISSN 1879-3460 (Electronic) 0168-1605 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30007201> >.
- 32 KURTZMAN, C.; FELL, J.; BOEKHOUT, T. The Yeasts: a taxonomic study definition, classification and nomenclature of the yeasts. **The Yeasts a Taxonomic Study**, p. 3-9, 01/01 2011.
- 33 KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. Elsevier Science, 2011. ISBN 9780080931272. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=yfg79rIIFIkC> >.
- 34 PRETORIUS, I.; WESTHUIZEN, T. J.; AUGUSTYN, O. P. H. Yeast Biodiversity in Vineyards and Wineries and Its Importance to the South African Wine Industry. A Review. **South African Journal of Enology & Viticulture**, v. 20, 05/01 2017.
- 35 ESTEVE-ZARZOSO, B. et al. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **Int J Syst Bacteriol**, v. 49 Pt 1, p. 329-37, Jan 1999. ISSN 0020-7713 (Print) 0020-7713 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10028278> >.
- 36 ESPINAR M.T.F., M. P., DE LLANOS R., QUEROL A. Molecular Methods to Identify and Characterize Yeasts in Foods and Beverages. In: QUEROL A., F. G. (Ed.). **Yeasts in Food and Beverages**. Berlin, Heidelberg. : Springer, (2006). p.55-82.
- 37 GODDARD, M. R. Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae*'s ecosystem engineering via fermentation. **Ecology**, v. 89, n. 8, p. 2077-82, Aug 2008. ISSN 0012-9658 (Print) 0012-9658 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18724717> >.
- 38 GODDARD, M. R.; GREIG, D. *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche? **FEMS Yeast Res**, v. 15, n. 3, May 2015. ISSN 1567-1356 (Print) 1567-1356.
- 39 MACLEAN, R. C.; GUDELJ, I. Resource competition and social conflict in experimental populations of yeast. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 498-501, May 25 2006. ISSN 0028-0836.
- 40 MCGOVERN, P. **Ancient wine: The search for the origins of viniculture**. 2003. 1-365
- 41 JAGTAP, U. B. et al. Synthetic biology stretching the realms of possibility in wine yeast research. **International Journal of Food Microbiology**, v. 252, p. 24-34, 2017/07/03/ 2017. ISSN 0168-1605. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160517301654> >.
- 42 SUÁREZ-LEPE, J. A.; MORATA, A. New trends in yeast selection for winemaking. **Trends in Food Science & Technology**, v. 23, n. 1, p. 39-50,

- 2012/01/01/ 2012. ISSN 0924-2244. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224411001567> >.
- 43 BIOTEK, A. Speciality Yeasts for Winemakers. 2021. Disponível em: <<https://wine.abbiotek.com/yeast-strains> >. Acesso em: 24 março 2021.
- 44 BENITO, J.; GONZÁLEZ-BENITO, Ó. A Review of Determinant Factors of Environmental Proactivity. **Business Strategy and the Environment**, v. 15, p. 87-102, 03/01 2006.
- 45 CIANI, M. et al. Non-conventional Yeast Species for Lowering Ethanol Content of Wines. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 642, 2016-May-04 2016. ISSN 1664-302X. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00642> >.
- 46 MESTRE FURLANI, M. V. et al. Selection of non-Saccharomyces yeasts to be used in grape musts with high alcoholic potential: a strategy to obtain wines with reduced ethanol content. **FEMS Yeast Research**, v. 17, n. 2, 2017. ISSN 1567-1356. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/femsyr/fox010> >. Acesso em: 2/11/2021.
- 47 WHITENER, E. et al. Managers as Initiators of Trust: An Exchange Relationship Framework for Understanding Managerial Trustworthy Behavior. **The Academy of Management Review**, 09/18 2013.
- 48 SCHMIDTKE, L. M.; BLACKMAN, J. W.; AGBOOLA, S. O. Production technologies for reduced alcoholic wines. **J Food Sci**, v. 77, n. 1, p. R25-41, Jan 2012. ISSN 1750-3841 (Electronic) 0022-1147 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22260123> >.
- 49 ROSSOUW, D.; BAUER, F. F. Exploring the phenotypic space of non-Saccharomyces wine yeast biodiversity. **Food Microbiol**, v. 55, p. 32-46, May 2016. ISSN 0740-0020.
- 50 SWIEGERS, J. H.; PRETORIUS, I. S. Yeast modulation of wine flavor. **Adv Appl Microbiol**, v. 57, p. 131-75, 2005. ISSN 0065-2164 (Print) 0065-2164.
- 51 FLEET, G. H. **Wine : microbiology and biotechnology**. Chur, Switzerland: Harwood Academic, 1993. ISBN 3718651327 9783718651320.
- 52 JOLLY, N. P.; VARELA, C.; PRETORIUS, I. S. Not your ordinary yeast: non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 2, p. 215-237, 2014. ISSN 1567-1356. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1567-1364.12111> >. Acesso em: 1/28/2022.
- 53 ENGLEZOS, V. et al. Exploitation of the non-Saccharomyces yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation: Physiological and molecular characterizations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 199, p. 33-40, 2015/04/16/ 2015. ISSN 0168-1605. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160515000203> >.

- 54 MARTIN, V. et al. Oenological Impact of the *Hanseniaspora/Kloeckera* Yeast Genus on Wines—A Review. **Fermentation**, v. 4, n. 3, p. 76, 2018. ISSN 2311-5637. Disponível em: < <https://www.mdpi.com/2311-5637/4/3/76> >.
- 55 PADILLA, B.; GIL, J. V.; MANZANARES, P. Past and Future of Non-Saccharomyces Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 411, 2016-March-31 2016. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00411> >.
- 56 HU, L. et al. Selection of non-Saccharomyces yeasts for orange wine fermentation based on their enological traits and volatile compounds formation. **J Food Sci Technol**, v. 55, n. 10, p. 4001-4012, Oct 2018. ISSN 0022-1155 (Print) 0022-1155.
- 57 ROJAS, V. et al. Studies on acetate ester production by non-Saccharomyces wine yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 283-289, 2001/11/08/ 2001. ISSN 0168-1605. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160501005529> >.
- 58 EGUE, L. A. N. et al. Virulence factors and determination of antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from palm wine and sorghum beer. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, p. 5-10, 2018/11/01/ 2018. ISSN 0882-4010. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401018310921> >.
- 59 EGUE, L. A. N. et al. Virulence factors and determination of antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from palm wine and sorghum beer. **Microb Pathog**, v. 124, p. 5-10, Nov 2018. ISSN 0882-4010.
- 60 ZOHRE, D. E.; ERTEN, H. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 319-324, 2002/11/01/ 2002. ISSN 1359-5113. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959202000869> >.
- 61 LUAN, Y. et al. Effects of different pre-fermentation cold maceration time on aroma compounds of *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentation with *Hanseniaspora opuntiae* or *Pichia kudriavzevii*. **LWT**, v. 92, p. 177-186, 2018/06/01/ 2018. ISSN 0023-6438. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643818301336> >.
- 62 BENITO, S. et al. Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia guilliermondii* in red wines produced following different fermentation strategies. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 15-23, 2011/01/01/ 2011. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610006709> >.
- 63 YAN, W. et al. Biotechnological applications of the non-conventional yeast *Meyerozyma guilliermondii*. **Biotechnology Advances**, v. 46, p. 107674,

- 2021/01/01/ 2021. ISSN 0734-9750. Disponível em: <
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975020301762> >.
- 64 ATZMÜLLER, D.; ULLMANN, N.; ZWIRZITZ, A. Identification of genes involved in xylose metabolism of *Meyerozyma guilliermondii* and their genetic engineering for increased xylitol production. **AMB Express**, v. 10, n. 1, p. 78, Apr 20 2020. ISSN 2191-0855 (Print) 2191-0855.
- 65 RENAULT, P. et al. Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, n. 3, p. 201-210, 2009/09/15/ 2009. ISSN 0168-1605. Disponível em: <
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160509003250> >.
- 66 BELY, M. et al. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. **Int J Food Microbiol**, v. 122, n. 3, p. 312-20, Mar 20 2008. ISSN 0168-1605 (Print) 0168-1605.
- 67 RODRÍGUEZ-SALARICHS, J.; GARCÍA DE LACOBÁ, M.; PRIETO, A. Versatile Lipases from the *Candida rugosa*-like Family: A Mechanistic Insight Using Computational Approaches. v. 61, n. 2, p. 913-920, Feb 22 2021. ISSN 1549-9596.
- 68 DE FREITAS, M. F. M. et al. Sustainable Lipase Production by *Diutina rugosa* NRRL Y-95 Through a Combined Use of Agro-Industrial Residues as Feedstock. v. 193, n. 2, p. 589-605, Feb 2021. ISSN 0273-2289.
- 69 SINGH, R. et al. *Aureobasidium pullulans*, An economically important black yeast. **Journal of Basic and Applied Mycology**, v. Volume 11, p. 1-4, 07/01 2015.
- 70 PETERSON, S. W.; MANITCHOTPISIT, P.; LEATHERS, T. D. *Aureobasidium thailandense* sp. nov. isolated from leaves and wooden surfaces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. Pt_2, p. 790-795, 2013. ISSN 1466-5026. Disponível em: <
<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.047613-0> >.
- 71 AGARBATI, A. et al. The Influence of Fungicide Treatments on Mycobiota of Grapes and Its Evolution during Fermentation Evaluated by Metagenomic and Culture-Dependent Methods. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, Apr 26 2019. ISSN 2076-2607 (Print) 2076-2607.
- 72 DE FELICE, D. V. et al. Strains of *Aureobasidium pullulans* can lower ochratoxin A contamination in wine grapes. **Phytopathology**, v. 98, n. 12, p. 1261-70, Dec 2008. ISSN 0031-949X (Print) 0031-949x.
- 73 PASSOTH, V. et al. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. **FEMS yeast research**, v. 6, p. 3-13, 02/01 2006.

- 74 SCHNEIDER, J. et al. Draft Genome Sequence of *Wickerhamomyces ciferrii* NRRL Y-1031 F-60-10. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 12, p. 1582-1583, 2012. Disponível em: < <https://ec.asm.org/content/eukcell/11/12/1582.full.pdf> >.
- 75 HUANG, Z.-R. et al. Exploring core functional microbiota responsible for the production of volatile flavour during the traditional brewing of Wuyi Hong Qu glutinous rice wine. **Food Microbiology**, v. 76, p. 487-496, 2018/12/01/ 2018. ISSN 0740-0020. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002018302582> >.
- 76 KONG, Y. et al. *In situ* Metabolic Characteristic Analysis Reveals the Key Yeast in the Spontaneous and Solid-state Fermentation Process of Chinese Light-style Liquor. **Applied and Environmental Microbiology**, p. AEM.04219-13, 2014. Disponível em: < <http://aem.asm.org/content/early/2014/04/07/AEM.04219-13.abstract> >.
- 77 JOOD, I.; HOFF, J. W.; SETATI, M. E. Evaluating fermentation characteristics of *Kazachstania* spp. and their potential influence on wine quality. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 129, 2017/06/05 2017. ISSN 1573-0972. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2299-1> >.
- 78 ROSA, C. A. et al. Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 3, p. 271-275, 2003/12/01/ 2003. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567135603001739> >.
- 79 TAKAHASHI, M. et al. Production of sophorolipid glycolipid biosurfactants from sugarcane molasses using *Starmerella bombicola* NBRC 10243. **J Oleo Sci**, v. 60, n. 5, p. 267-73, 2011. ISSN 1345-8957.
- 80 SADOUDI, M. et al. Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. **Food Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 243-253, 2012/12/01/ 2012. ISSN 0740-0020. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S074000201200130X> >.
- 81 COX, D. L. N. M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. Porto Alegre: 2014.
- 82 ZAMORA, F. Biochemistry of Alcoholic Fermentation. In: MORENO-ARRIBAS, M. V. e POLO, M. C. (Ed.). **Wine Chemistry and Biochemistry**. New York, NY: Springer New York, 2009. p.3-26. ISBN 978-0-387-74118-5.
- 83 CHATONNET, P. et al. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 62, n. 2, p. 191-202, 1993. ISSN 0022-5142. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.2740620213> >.

- 84 LAMBRECHTS, M.; PRETORIUS, I. Yeast and its importance to wine aroma. **S. Afr. J. Enol. Vitic.**, v. 21, p. 97-129, 01/01 2000.
- 85 CORDENTE, A. G. et al. Flavour-active wine yeasts. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 96, n. 3, p. 601-18, Nov 2012. ISSN 0175-7598 (Print) 0175-7598.
- 86 STYGER, G.; PRIOR, B.; BAUER, F. F. Wine flavor and aroma. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1145-1145, 2011. ISSN 1367-5435. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1018-4> >. Acesso em: 3/18/2021.
- 87 TAO, Y. et al. Volatile compounds of young Cabernet Sauvignon red wine from Changli County (China). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 8, p. 689-694, 2008/12/01/ 2008. ISSN 0889-1575. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157508000756> >.
- 88 SWIEGERS, J. et al. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 11, p. 139-173, 01/01 2005.
- 89 SCHULTHESS, D.; ETTLINGER, L. INFLUENCE OF THE CONCENTRATION OF BRANCHED CHAIN AMINO ACIDS ON THE FORMATION OF FUSEL ALCOHOLS. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 84, n. 4, p. 240-243, 1978. ISSN 0046-9750. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/j.2050-0416.1978.tb03881.x> >.
- 90 COLLIN, S.; DERDELINCKX, G.; DUFOUR, J.-P. Relationships between the chemical composition and sensory evaluation of lager beers. **Food Quality and Preference**, v. 5, n. 1, p. 145-149, 1994/01/01/ 1994. ISSN 0950-3293. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0950329394900213> >.
- 91 EBELER, S. E. ANALYTICAL CHEMISTRY: UNLOCKING THE SECRETS OF WINE FLAVOR. **Food Reviews International**, v. 17, n. 1, p. 45-64, 2001/03/14 2001. ISSN 8755-9129. Disponível em: < <https://doi.org/10.1081/FRI-100000517> >.
- 92 RAPP, A.; VERSINI, G. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. In: (Ed.). **Developments in food science**: Elsevier, v.37, 1995. p.1659-1694. ISBN 0167-4501.
- 93 BELY, M.; RINALDI, A.; DUBOURDIEU, D. Influence of Assimilable Nitrogen on Volatile Acidity Production by *Saccharomyces cerevisiae* during High Sugar Fermentation. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 96, p. 507-12, 02/01 2003.
- 94 SAERENS, S. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 Genes Encode Novel Enzymes with Medium-chain Fatty Acid Ethyl Ester Synthesis and Hydrolysis Capacity. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, p. 4446-56, 03/01 2006.

- 95 LEE, S.-J. et al. Dynamic changes in ester formation during chardonnay juice fermentations with different yeast inoculation and initial brix conditions. **American journal of enology and viticulture**, v. 55, n. 4, p. 346-354, 2004. ISSN 0002-9254.
- 96 STRIBNY, J.; QUEROL, A.; PÉREZ-TORRADO, R. Differences in Enzymatic Properties of the *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces uvarum* Alcohol Acetyltransferases and Their Impact on Aroma-Active Compounds Production. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 897, 2016-June-07 2016. ISSN 1664-302X. Disponível em: <
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00897> >.
- 97 MESTRES, M.; BUSTO, O.; GUASCH, J. Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1, p. 569-581, 2000/06/09/ 2000. ISSN 0021-9673. Disponível em: <
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196730000220X> >.
- 98 MOREIRA, N. et al. Volatile sulphur compounds in wines related to yeast metabolism and nitrogen composition of grape musts. **Analytica Chimica Acta**, v. 458, n. 1, p. 157-167, 2002/04/29/ 2002. ISSN 0003-2670. Disponível em: <
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326700101618X> >.
- 99 SMITH, M. E. et al. Sources of volatile sulfur compounds in wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 21, n. S1, p. 705-712, 2015. ISSN 1322-7130. Disponível em: <
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ajgw.12193> >.
- 100 RIZZON, L. A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Cabernet Sauvignon para elaboração de vinho tinto. **Food Science and Technology**, v. 22, p. 192-198, 2002. ISSN 0101-2061. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612002000200015&nrm=iso >.
- 101 RAUHUT, D. Yeasts-production of sulfur compounds. **Wine microbiology and biotechnology**, v. 6, p. 183-223, 1993.
- 102 SCHRÖDTER, R. M. A. Amerine, H. W. Berg, R. E. Kunkee, C. S. Ough, V. L. Singleton und A. D. Webb: The Technology of Wine Making. 4. Aufl., 794 Seiten, 123 Abb., 72 Tab. AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, 1980. Preis: 42,50 \$. **Food / Nahrung**, v. 25, n. 10, p. 976-976, 1981. ISSN 0027-769X. Disponível em: <
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/food.19810251017> >.
- 103 MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, C. **Wine Chemistry and Biochemistry**. Springer New York, 2008. ISBN 9780387741185. Disponível em: <
https://books.google.com.br/books?id=q_AkYRM-RR8C >.

- 104 SPIROPOULOS, A.; BISSON, L. F. MET17 and hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, n. 10, p. 4421-6, Oct 2000. ISSN 0099-2240 (Print) 0099-2240.
- 105 THOMAS, D.; SURDIN-KERJAN, Y. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 61, n. 4, p. 503-32, Dec 1997. ISSN 1092-2172 (Print) 1092-2172.
- 106 LANDAUD, S.; HELINCK, S.; BONNARME, P. Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 77, n. 6, p. 1191-205, Jan 2008. ISSN 0175-7598 (Print) 0175-7598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18064452> >.
- 107 HUANG, C.-W. et al. Hydrogen sulfide and its roles in *Saccharomyces cerevisiae* in a winemaking context. **FEMS Yeast Research**, v. 17, n. 6, 2017. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox058> >. Acesso em: 4/13/2021.
- 108 MENDES-FERREIRA, A.; MENDES-FAIA, A.; LEÃO, C. Survey of Hydrogen Sulphide Production by Wine Yeasts. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 6, p. 1033-1037, 2002. ISSN 0362-028X. Disponível em: < <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.6.1033> >. Acesso em: 3/18/2021.
- 109 BELL, S.-J.; HENSCHKE, P. A. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 11, n. 3, p. 242-295, 2005. ISSN 1322-7130. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x> >.
- 110 SPIROPOULOS, A. et al. Characterization of hydrogen sulfide formation in commercial and natural wine isolates of *Saccharomyces*. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 51, p. 233-248, 01/01 2000.
- 111 SANTOS, A. A. D. et al. Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2017. ISSN 1981-6723. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S198167232017000100402&nrm=iso >.
- 112 HOFFMAN, C. S. Preparation of yeast DNA. **Curr Protoc Mol Biol**, v. Chapter 13, p. Unit13 11, May 2001. ISSN 1934-3647 (Electronic) 1934-3647 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18265095> >.
- 113 SANGER, F. et al. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. **Nature**, v. 265, n. 5596, p. 687-695, 1977/02/01 1977. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/265687a0> >.
- 114 HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, 1999.

- 115 KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Mol Biol Evol**, v. 30, n. 4, p. 772-80, Apr 2013. ISSN 1537-1719 (Electronic) 0737-4038 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23329690> >.
- 116 POSADA, D. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Mol Biol Evol**, v. 25, n. 7, p. 1253-6, Jul 2008. ISSN 1537-1719 (Electronic) 0737-4038 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18397919> >.
- 117 GUINDON, S. et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Syst Biol**, v. 59, n. 3, p. 307-21, May 2010. ISSN 1076-836X (Electronic) 1063-5157 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20525638> >.
- 118 BASSI, A. P. et al. Potassium metabisulphite as a potential biocide against *Dekkera bruxellensis* in fuel ethanol fermentations. **Lett Appl Microbiol**, v. 60, n. 3, p. 248-58, Mar 2015. ISSN 0266-8254.
- 119 ONO, B. et al. Role of hydrosulfide ions (HS⁻) in methylmercury resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol**, v. 57, n. 11, p. 3183-6, Nov 1991. ISSN 0099-2240 (Print) 0099-2240.
- 120 JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P. A. Validation of bismuth-containing indicator media for predicting H₂S-producing potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine under enological conditions. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 46, p. 269-273, 01/01 1995.
- 121 PRADO, C. D. et al. Physiological characterization of a new thermotolerant yeast strain isolated during Brazilian ethanol production, and its application in high-temperature fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 1, p. 178, 2020/10/27 2020. ISSN 1754-6834. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01817-6> >.
- 122 OXOID, S. A. **Products: Lysine medium.**
- 123 CARVALHO-NETTO, O. V. et al. A simple and effective set of PCR-based molecular markers for the monitoring of the *Saccharomyces cerevisiae* cell population during bioethanol fermentation. **J Biotechnol**, v. 168, n. 4, p. 701-9, Dec 2013. ISSN 1873-4863 (Electronic) 0168-1656 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23994268> >.
- 124 CORDERO-BUESO, G. et al. Influence of different floor management strategies of the vineyard on the natural yeast population associated with grape berries. **International journal of food microbiology**, v. 148, p. 23-9, 07/15 2011.
- 125 BAR-SHIMON, M. et al. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Curr Genet**, v. 45, n. 3, p. 140-8, Mar 2004. ISSN 0172-8083 (Print) 0172-8083.

- 126 WISNIEWSKI, M. et al. Postharvest biocontrol: New concepts and applications. **Biological Control: A Global Perspective**, 08/20 2007. ISSN 9781845932657.
- 127 JEANDET, P. et al. Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 2731-2741, 2002/05/08 2002. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <https://doi.org/10.1021/jf011429s> >.
- 128 SIPI CZKI, M. Yeast two- and three-species hybrids and high-sugar fermentation. **Microbial biotechnology**, v. 12, n. 6, p. 1101-1108, 2019. ISSN 1751-7915. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30838806> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6801140/> >.
- 129 ROMANO, P. et al. Function of yeast species and strains in wine flavour. **Int J Food Microbiol**, v. 86, n. 1-2, p. 169-80, Sep 1 2003. ISSN 0168-1605 (Print)0168-1605 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12892932> >.
- 130 PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.