

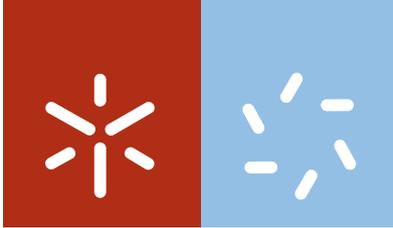


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Maria Eugénia Gonçalves Vieira
**Novos produtos biotecnológicos e serviços
para a indústria dos vinhos**

Maria Eugénia Gonçalves Vieira

**Novos produtos biotecnológicos e serviços
para a indústria dos vinhos**



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Maria Eugénia Gonçalves Vieira

**Novos produtos biotecnológicos e serviços
para a indústria dos vinhos**

Tese de Doutoramento em Ciências
Especialidade em Biologia

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Margarida Casal

dezembro de 2016

DECLARAÇÃO

Nome: Maria Eugénia Gonçalves Vieira

Endereço eletrónico: eugeniavieira@bio.uminho.pt

Título da tese de doutoramento:

Novos produtos biotecnológicos e serviços para a indústria dos vinhos

Orientadora:

Professora Doutora Margarida Casal

Ano de conclusão:

2016

Designação do doutoramento:

Ciências

Especialidade de Biologia

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE,
APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO,
MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO
QUE A TAL SE COMPROMETE

Universidade do Minho, 23/12/2016

Assinatura: Maria Eugénia Gonçalves Vieira

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração da presente tese. Confirmando que em todo o trabalho conducente à sua elaboração não recorri à prática de plágio ou qualquer forma de falsificação de resultados.

Mais declaro que tomei conhecimento integral do Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Universidade do Minho, 23 de dezembro de 2016.



Maria Eugénia Gonçalves Vieira

AGRADECIMENTOS

“I've learned that people will forget what you said, people will forget what you did,
but people will never forget how you made them feel.” — Maya Angelou

A realização deste doutoramento contou com o apoio e o incentivo de muitas pessoas, às quais expresso aqui o meu agradecimento.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à coordenadora da empresa Vinalia, Mestre Isabel Araújo, e às Professoras Dorit Schuller e Margarida Casal, a oportunidade de realizar este trabalho. Desde o início do doutoramento, a Dra. Isabel demonstrou confiança na minha capacidade para a sua concretização e disponibilidade para acompanhar as diferentes fases do trabalho, e por isso estar-lhe-ei sempre grata. O contributo do seu conhecimento na área da enologia foi muito importante para a realização deste estudo. À Professora Dorit Schuller agradeço a partilha do conhecimento científico, nomeadamente na genotipagem e fenotipagem de leveduras, assim como o planeamento do trabalho prático realizado. À Professora Margarida Casal agradeço o aconselhamento científico, o pragmatismo e a motivação que foram fundamentais para concluir esta dissertação.

Às diretoras do Departamento de Biologia e do Centro de Biologia Molecular e Ambiental, Professora Margarida Casal e Professora Cândida Lucas, agradeço os recursos concedidos durante a execução do trabalho prático.

À direção da Estação Vitivinícola Amândio Galhano agradeço a disponibilidade das instalações e da matéria-prima para realizar parte do trabalho experimental. Um agradecimento muito especial à Eng.^a Teresa Mota e ao Eng.^o João Garrido por toda a ajuda e boa disposição com que sempre me receberam.

Ao meu “colega” João, que ao longo de todos estes anos de trabalho em conjunto se foi revelando um grande amigo e parceiro, agradeço a boa disposição que dissipava as frustrações do trabalho científico (e não só), a troca de experiências que contribuíram para o avanço do trabalho, a grande ajuda na revisão do texto da tese, o incentivo para terminar esta etapa...muito obrigada amigo!

Agradeço também aos meus colegas de laboratório o companheirismo e a apoio ao longo deste trabalho: à Joana Sá Pessoa, amiga e parceira de bancada, pela ajuda com as experiências nas férias de verão; ao Raúl Machado, sempre disponível para resolver os problemas técnicos; à Inês Mendes e à Daniela Bessa pela ajuda com o equipamento de HPLC; e os colegas Ricardo Duarte, Raquel, Filipa Pereira, Ângela Carvalho, Marlene, Gabriel, Nuno Fonseca, João Silva, André Costa e Pedro Castro, que sempre me auxiliaram e contribuíram para o bom ambiente de trabalho.

Aos técnicos e auxiliares do departamento de Biologia, Magda, Manuela Rodrigues, Amaro, Manuela Teixeira, Cristina, D. Isabel, D. Ana, Sr. Adelino, D. Rosa, Paula e Liliana, que sempre fizeram o possível (e às vezes o impossível) para me facultar os materiais necessários à realização do trabalho, muito obrigada!

Ao Professor José Maria Oliveira, do departamento de Engenharia Biológica, e à Dra. Isabel Araújo, agradeço a ajuda com as análises de GC-MS.

Muito obrigada a todas as pessoas que participaram na análise sensorial dos vinhos em estudo, e à Dra. Isabel Araújo que fez o tratamento dos dados.

Agradeço também à Herdade do Esporão, Herdade dos Coelheiros, Casal Branco, Quinta do Casal Monteiro, Adega Luís Pato, Real Companhia Velha, Quinta de La Rosa, Quinta do Perdigão, Quinta da Lixa, Quinta da Cancela e Quinta da Covela, pela colaboração e cedência de uvas para o estudo.

Às minhas amigas Sofia Machado e Célia Tavares, muito obrigada por todo apoio ao longo destes anos de trabalho no departamento de Biologia.

Por fim agradeço à minha família, em particular ao Armando e à minha filha que me inspiram com a sua alegria e me dão força nos momentos mais difíceis, e à minha mãe pelo seu apoio incondicional. Ao meu pai, exemplo de integridade e coragem que continua sempre vivo na minha memória, dedico este trabalho.

RESUMO

A principal finalidade deste doutoramento em empresa foi diversificar os produtos e serviços da Vinalia dirigidos à indústria vitivinícola, através do desenvolvimento de soluções sustentadas no setor da biotecnologia de leveduras. Com este trabalho procurou-se desenvolver serviços inovadores de tipagem molecular de leveduras, implementando-se métodos rápidos e especializados com aplicação nesta indústria. Pretendeu-se ainda explorar a biodiversidade de estirpes com potencial enológico, isoladas em diferentes regiões vitivinícolas portuguesas, e a sua utilização na produção de vinhos de elevada qualidade.

A abordagem principal para a obtenção de novas estirpes de leveduras para aplicação enológica tem sido centrada na exploração da diversidade presente nos ambientes vitivinícolas. Os estudos da diversidade inter- e intraespecífica de leveduras envolvem geralmente a análise genotípica de um grande número de amostras biológicas, sendo necessário métodos eficientes para o rápido isolamento de DNA. Desta forma, foi desenvolvido e validado um método de extração de DNA, baseado num formato de microplacas de 96 poços, para *Saccharomyces cerevisiae* e outras espécies de leveduras. A gama de concentrações do DNA obtido variou entre 20 a 50 ng/mL, o que permitiu a utilização direta nas amplificações por PCR para os métodos de tipagem molecular usados na identificação de leveduras e na delimitação de estirpes de *S. cerevisiae*. O protocolo miniaturizado de extração de DNA permitiu o processamento manual de 16 microplacas (1536 isolados) num dia de trabalho. O custo dos consumíveis e reagentes foi significativamente inferior ao associado às opções disponíveis comercialmente.

A colheita de 66 amostras de uvas, de diferentes castas, em seis regiões vitivinícolas portuguesas (Vinhos Verdes, Dão, Douro, Bairrada, Tejo e Alentejo), permitiu obter 1500 isolados de leveduras. Recorrendo à análise de sequências interdelta, diferenciaram-se 64 estirpes de *S. cerevisiae*, que foram submetidas a um programa de seleção tendo por fim a sua aplicação enológica. Os seguintes critérios foram sequencialmente analisados: duração da fermentação, perfil organolético, resistência ao dióxido de enxofre (SO₂), tolerância ao etanol, fenómeno *killer*, produção de sulfureto de hidrogénio (H₂S), atividade β-glucosidásica, e concentrações dos principais metabolitos (etanol, glicerol e ácido acético) no final da fermentação, assim como dos açúcares residuais (glucose e frutose). Neste procedimento foi selecionada uma estirpe (D3).

Os testes à escala laboratorial, geralmente utilizados no processo de seleção de leveduras, não reproduzem com exatidão as fermentações à escala industrial. Assim, foi avaliado o comportamento fermentativo da estirpe D3 em vinificações à escala piloto e industrial. Foram vinificados oito mostos de castas de uvas brancas e quatro de uvas tintas, tendo-se verificado a implantação efetiva da estirpe D3 em todas elas. Em paralelo, foram realizados ensaios com uma levedura comercial (Lalvin QA23[®]) em três das castas de uvas brancas. As análises aos compostos voláteis dos três vinhos produzidos em paralelo revelaram que apenas nos vinificados com a estirpe D3, o 9-decenoato de etilo estava presente em teores superiores ao limiar de perceção. A análise sensorial evidenciou um aroma frutado mais intenso no vinho produzido com a levedura D3 relativamente ao obtido com a comercial. Os resultados indicaram que a formação de concentrações significativas deste éster, que confere um aroma frutado, é considerada como uma característica metabólica desta estirpe.

No âmbito deste trabalho realizou-se a análise das características enológicas de seis populações de estirpes de *S. cerevisiae*, correspondentes aos isolados obtidos em seis regiões vitivinícolas. Este estudo teve por objetivo avaliar se as estirpes da mesma população compartilhavam fenótipos adaptativos às condições ambientais específicas da sua região. As características fenotípicas (resistência ao SO₂, tolerância ao etanol, fenómeno *killer*, produção de H₂S, atividade β-glicosidásica e utilização da galactose como fonte de carbono) não apresentaram diferenças significativas entre as populações. A concentração dos metabolitos produzidos foi diversa, sugerindo que as estirpes utilizaram diferentes estratégias metabólicas para responder aos condicionalismos ambientais, independentemente da sua região de origem. Contudo, verificou-se que as microfermentações conduzidas mais rapidamente estavam associadas às leveduras pertencentes à região de proveniência do mosto. Esta observação suporta a hipótese de que as estirpes estão mais adaptadas às características dos mostos da sua área vitivinícola.

Do trabalho reportado nesta tese de doutoramento resultou o *know-how* científico e técnico para a conceção de um serviço de isolamento, seleção e caracterização de leveduras enológicas autóctones. Foi constituída uma coleção de 64 estirpes de *S. cerevisiae* provenientes das principais regiões vitivinícolas portuguesas. Esta coleção representa um importante recurso biológico que a empresa pode explorar para diversificar a oferta de leveduras *starter* disponíveis no mercado. Por fim, vinificações à escala piloto e industrial conduzidas por uma estirpe isolada no âmbito desta tese, confirmaram as suas características enológicas diferenciadoras.

ABSTRAT

The major aim of this doctorate in company was to diversify Vinalia's products and services to the wine industry, through the development of solutions sustained in the yeast biotechnology sector. This work sought to develop innovative services of yeast molecular typing, by implementing quick and specialized methods with application in this industry. It was also intended to explore the strains biodiversity with oenological potential, isolated from several Portuguese wine regions, and its application in the production of high quality wines.

The main approach to obtain new strains for oenological application has been centered on the exploitation of the yeast diversity present in wine environments. Studies of yeasts inter- and intraspecific diversity often encompasses genotypic analysis of a large number of biological samples and, therefore, efficient methods for the rapid isolation of DNA are required. Thus, a DNA extraction method, based on a 96 wells microplate format, was developed and validated for *Saccharomyces cerevisiae* and other yeast species. The range of DNA concentration obtained was between 20 and 50 ng/mL, which allowed the direct use in PCR amplifications for the general molecular typing methods used in yeast identification and *S. cerevisiae* strains delimitation. The miniaturized DNA extraction protocol allowed manual processing 16 microplates (1536 isolates) in one working day. The cost of consumables and reagents was significantly lower than that associated to the commercially available options.

A 66 samples collecting of different grape varieties, in six Portuguese wine regions (Vinhos Verdes, Dão, Douro, Bairrada, Tejo and Alentejo), allowed gathering 1500 yeast isolates. Interdelta sequences analysis differentiated 64 *S. cerevisiae* strains, which were subjected to a selection program for oenological application purposes. The following criteria were sequentially analyzed: fermentation duration, organoleptic profile, resistance to sulfur dioxide (SO₂), ethanol tolerance, killer phenomenon, hydrogen sulfide (H₂S) production, β-glucosidase activity, and concentrations of major metabolites (ethanol, glycerol and acetic acid) at the end of the fermentation, as well as residual sugars (glucose and fructose). One strain (D3) was selected in this procedure.

Laboratory scale tests, generally used in the yeasts selection process, do not reproduce accurately the fermentations at industrial scale. Thus, the fermentative performance of the strain D3 was evaluated at pilot and industrial wine fermentation scales. Eight musts of white and four

of red grape varieties were vinified, and the effective implantation of the D3 strain was observed in all of them. In parallel, a commercial yeast (Lalvin QA23[®]) was tested in three of the varietal white musts. The analysis of the volatile compounds of the three wines produced in parallel revealed that only in the ones obtained with the strain D3, ethyl 9-decenoate was present at concentrations above the perception threshold. The sensory analysis showed that a more intense fruity aroma was detected in the wine produced with the D3 yeast in comparison to the wine obtained with the commercial starter. The results indicated that the formation of significant concentrations of this ester, which confers a fruity aroma, is regarded as a metabolic feature of this strain.

The analysis of enological properties of six *S. cerevisiae* strains populations, respectively isolated from six wine regions, was accomplished in the scope of this work. This study aimed to assess whether the strains of the same population shared adaptive phenotypes specific to the environmental conditions of that region. The phenotypic characteristics (resistance to SO₂, ethanol tolerance, killer phenomenon, H₂S production, β -glucosidase activity and utilization of galactose as a carbon source) did not differ significantly between populations. The produced metabolites concentration was diverse, suggesting that the strains used different metabolic strategies to respond to environmental constraints, regardless of their region of origin. However, it was found that the fastest microfermentations were conducted by the yeasts belonging to the same wine region of the must. This observation supports the hypothesis that yeast strains might be better adapted to the must characteristics of its own viticultural area.

The work developed in this PhD thesis lead to scientific and technical know-how that allowed the designing of a service to isolate, select and characterize autochthonous wine yeasts. A collection of 64 strains of *S. cerevisiae*, from the main Portuguese wine regions, was established, representing an important biological resource. This collection can be exploited by the company to diversify the yeast starters offered on the market. Finally, pilot and industrial scale wine fermentations conducted by a strain selected in the scope of this thesis, have confirmed its distinctive oenological characteristics.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
ABSTRAT	IX
ÍNDICE	XI
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS	XIV
LISTA DE FIGURAS	XVI
LISTA DE TABELAS	XIX
LISTA DE PUBLICAÇÕES	XXI
CAPÍTULO I	1
ENQUADRAMENTO GERAL	1
1 MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS	3
2 ESTRUTURA DA TESE	4
CAPÍTULO II	7
INTRODUÇÃO GERAL	7
1 PERSPETIVA HISTÓRICA	9
2 DIVERSIDADE DE LEVEDURAS E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS	11
3 EVOLUÇÃO E DIVERSIDADE DE <i>S. CEREVISIAE</i>	16
4 CARACTERÍSTICAS ENOLÓGICAS DAS LEVEDURAS VÍNICAS: DIVERSIDADE INTRA-ESPECÍFICA DE <i>S. CEREVISIAE</i>	17
5 AS BASES GENÉTICAS DA DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE <i>S. CEREVISIAE</i>	22
6 O MERCADO GLOBAL DAS LEVEDURAS	24
6.1 O MERCADO GLOBAL DO VINHO E DAS LEVEDURAS ENOLÓGICAS	25
6.2 TENDÊNCIAS DO MERCADO DO VINHO	28
7 NOVOS <i>STARTERS</i> DE LEVEDURAS PARA APLICAÇÃO ENOLÓGICA	29
7.1 MUTAGÉNESE	31
7.2 HIBRIDIZAÇÃO	32
7.3 EVOLUÇÃO ADAPTATIVA	33
CAPÍTULO III	37
EXTRAÇÃO DE DNA DE LEVEDURAS EM MICROPLACAS: UM MÉTODO SIMPLES, ECONÓMICO E DE ALTO DÉBITO	37
1 INTRODUÇÃO	40
2 MATERIAIS E MÉTODOS	41

2.1	ESPÉCIES E ESTIRPES DE LEVEDURAS	41
2.2	OTIMIZAÇÃO DO VOLUME DE CULTURA E DO TEMPO DE CENTRIFUGAÇÃO PARA O ISOLAMENTO DE DNA EM MICROPLACAS	42
2.3	VALIDAÇÃO DO PROTOCOLO DE ISOLAMENTO DE DNA EM MICROPLACAS	42
2.4	REPRODUTIBILIDADE DO PROTOCOLO DE ISOLAMENTO DE DNA EM MICROPLACAS	43
2.5	QUANTIFICAÇÃO DO DNA	43
2.6	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS	43
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
CAPÍTULO IV		51
SELEÇÃO DE ESTIRPES VÍNICAS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE ISOLADAS EM PORTUGAL		51
1	INTRODUÇÃO	54
2	MATERIAIS E MÉTODOS	58
2.1	PLANO DE AMOSTRAGEM E OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS	58
2.2	ISOLAMENTO DE DNA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	60
2.3	CARACTERIZAÇÃO ENOLÓGICA E FENOTÍPICA	61
2.3.1	Testes fenotípicos	61
2.3.1.1	Tolerância ao etanol	61
2.3.1.2	Resistência ao dióxido de enxofre	62
2.3.1.3	Potencial de produção de sulfureto de hidrogénio	62
2.3.1.4	Fenómeno killer	62
2.3.1.5	Atividade β -glucosidásica	63
2.3.2	Microfermentações	63
2.3.3	Análises químicas dos vinhos	64
2.3.4	Prova organoléptica olfativa	64
3	RESULTADOS	64
4	DISCUSSÃO	75
CAPÍTULO V		83
AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE UMA LEVEDURA VÍNICA EM FERMENTAÇÕES À ESCALA PILOTO E INDUSTRIAL		83
1	INTRODUÇÃO	86
2	MATERIAIS E MÉTODOS	90
2.1	ESTIRPES DE LEVEDURAS	90
2.2	CASTAS E PROCESSAMENTO DAS UVAS	91
2.3	CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO	92
2.4	ISOLAMENTO E PERFIS GENÉTICOS DAS ESTIRPES DE <i>S. CEREVISIAE</i>	92
2.5	ANÁLISES QUÍMICAS	93
2.6	ANÁLISE DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO AROMA	93
2.7	ANÁLISE SENSORIAL	93
2.8	DETERMINAÇÃO DE TIÓS VOLÁTEIS	94

3	RESULTADOS	94
4	DISCUSSÃO	113
CAPÍTULO VI		121
LEVEDURAS “À LA CARTE”: CARACTERIZAÇÃO ENOLÓGICA DE LEVEDURAS AUTÓCTONES DE SEIS REGIÕES VITIVINÍCOLAS PORTUGUESAS.		121
1	INTRODUÇÃO	124
2	MATERIAIS E MÉTODOS	130
2.1	ESTIRPES DE LEVEDURAS	130
2.2	TESTES FENOTÍPICOS	131
2.3	MICROFERMENTAÇÕES	131
2.4	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS DOS VINHOS	132
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	132
3	RESULTADOS	133
4	DISCUSSÃO	142
CAPÍTULO VII		147
DISCUSSÃO GERAL E PERSPETIVAS DE TRABALHO		147
1	DISCUSSÃO GERAL E PERSPETIVAS DE TRABALHO	149
CAPÍTULO VIII		155
BIBLIOGRAFIA		155
ANEXO I		181
DINAMIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE I&D NA EMPRESA VINALIA		181
1	DESCRIÇÃO DA EMPRESA E DOS PROJETOS DE I&D REALIZADOS/EM CURSO	184
2	RENTABILIZAÇÃO DOS TRABALHOS EM CURSO	184
3	CANDIDATURA A NOVOS PROJECTOS DE I&D	186
4	OUTROS	186
ANEXO II		189
LISTA DAS ESTIRPES ISOLADAS		189
ANEXO III		193
DADOS COMPLEMENTARES		193

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

% (p/v)	percentagem em peso por volume
% (v/v)	percentagem em volume por volume
μL	microlitro
μm	micrómetro
a. C.	antes de Cristo
bp	pares de bases do inglês <i>base pairs</i>
CAGR	taxa composta de crescimento anual do inglês <i>Compound Annual Growth Rate</i>
CNV	variação do número de cópias do inglês <i>Copy Number Variations</i>
D.O. _{xxx} nm	densidade ótica determinada a um comprimento de onda de xxx nm
DNA	ácido desoxirribonucleico do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	desoxinucleótidos trifosfato do inglês <i>deoxynucleotides triphosphate</i>
e.g.	por exemplo do latim <i>exempli gratia</i>
etc.	e o resto do latim <i>et cetera</i>
FTIR	espectroscopia de infravermelho com transformada de <i>Fourier</i> do inglês <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
g	grama
GC-MS	cromatografia gasosa e espectrometria de massa do inglês <i>Gas Chromatography and Mass Spectrometry</i>
GI	indicação geográfica do inglês <i>Geographical Indication</i>
h	horas
hL	hectolitro
HPLC	cromatografia líquida de alta performance do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>
I&D	Investigação e desenvolvimento
i.e.	isto é do latim <i>is est</i>
ITS	espaçador interno transcrito do inglês <i>internal transcribed spacer</i>
IVV	Instituto da Vinha e do Vinho
L	litro
LSU	grande subunidade de rRNA do inglês <i>large subunit rRNA</i>
M	molar

mg	miligrama
MGM	microrganismo geneticamente modificado
MhL	milhões de hectolitros
min	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
mol	mole
N	normalidade
ng	nanograma
nm	nanómetros
OAV	valor da atividade de odor do inglês <i>odor activity value</i>
°C	graus centígrados
OIV	Organização internacional da vinha e do vinho
PCR	reação em cadeia da polimerase do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
pmol	picomole
RFLP	polimorfismos do tamanho de fragmentos de restrição do inglês <i>restriction fragments length polymorphism</i>
RI	índice de refração do inglês <i>refractive index</i>
rpm	rotação por minuto
rRNA	ácido ribonucleico ribossomal do inglês <i>ribosomal ribonucleic acid</i>
SNPs	polimorfismos de nucleótido simples do inglês <i>single nucleotide polymorphisms</i>
U	Unidade de atividade enzimática, definida como a quantidade de enzima que hidrolisa o substrato a uma velocidade reacional de 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$
UV	ultra violeta
V	Volt
Y	Rendimento do inglês <i>Yield</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura II-1: Áreas de aplicação da biotecnologia de leveduras (adaptado de Johnson, 2013a).....	15
Figura II-2: Produção e consumo mundial de vinho nos últimos 14 anos (OIV, 2015, 2014a, 2014b).....	25
Figura III-1: Concentração de DNA (barras) obtida a partir de culturas da estirpe <i>S. cerevisiae</i> L507, crescidas durante 12 h em diferentes volumes de meio YPD (30, 50, 100 e 150 µL), e usando diferentes tempos de centrifugação (5, 10, 15, 30 e 60 min). Os rácios A_{260}/A_{280} apresentam-se indicados nos números dentro dos círculos.	45
Figura III- 2: Concentrações de DNA obtidas para 12 espécies de leveduras e 12 estirpes de <i>S. cerevisiae</i> , usando diferentes escalas (microtubos µg/µL; microplacas, ng/µL).	46
Figura III- 3: Comparação dos perfis obtidos por amplificação por PCR com DNA extraído usando microtubos (T) e microplacas (P); A) Amplificação de sequências interdelta do DNA obtido a partir das estirpes de <i>S. cerevisiae</i> L507, L508, L509, L510, L517, L528; B) Amplificação de sequências ITS das espécies de leveduras <i>C. tropicalis</i> , <i>Y. lipolytica</i> , <i>D. bruxellensis</i> , <i>K. fluxuum</i> , <i>L. thermotolerans</i> e <i>C. stellata</i>	47
Figura III- 4: Reprodutibilidade de quatro réplicas independentes de amplificações a partir de DNA extraído pela abordagem das microplacas. A) Amplificação de sequências interdelta de seis estirpes de <i>S. cerevisiae</i> . B) Perfis de ITS-RFLP das espécies de leveduras <i>C. tropicalis</i> , <i>Y. lipolytica</i> , <i>D. bruxellensis</i> , <i>K. fluxuum</i> , <i>L. thermotolerans</i> e <i>C. stellata</i>	49
Figura IV- 1: Localização geográfica das 11 vinhas do plano de amostragem e as castas de uva correspondentes.	59
Figura IV- 2: Exemplos de perfis da amplificação de sequências interdelta dos isolados de levedura recolhidos no final das fermentações espontâneas.	66
Figura IV- 3: Perfis das fermentações espontâneas (linhas) correspondentes às amostras das 11 vinhas e estirpes de <i>S. cerevisiae</i> diferenciadas no final de cada uma (esquerda); e a proporção de cada estirpe relativamente ao número total de isolados (barras) observadas no final de cada fermentação (direita). As vinhas das diferentes regiões estão numeradas de 1 a 11. Para cada vinha são apresentados os resultados relativos a sete amostras, uma composta e seis não compostas. Em cada perfil de fermentação, encontram-se referidas as designações das estirpes de <i>S. cerevisiae</i> diferenciadas. As designações sublinhadas correspondem às estirpes identificadas nas amostras compostas e a designação n.a. (não aplicável) corresponde às amostras que não fermentaram.....	67
Figura IV-4: Resultados dos testes fenotípicos, representados como número de estirpes que são produtoras de H ₂ S, que têm atividade β-glucosidásica e fenótipo <i>killer</i> (A), e são resistentes a diferentes concentrações de etanol e SO ₂ (B). As classificações qualitativas utilizadas nos testes de produção de H ₂ S e atividade β-glucosidase foram: sem produção/atividade, 0; baixa produção/atividade, 1; produção/atividade intermédia, 2, e produção/atividade elevada, 3, respetivamente.	71

Figura IV- 5: Resumo da duração das microfermentações das 49 estirpes de *S. cerevisiae* que iniciaram a fermentação (assim como a da estirpe de referência Lalvin QA23®) e da prova organolética dos vinhos obtidos (A), e as características enológicas dessas estirpes (B). (A) Cada barra corresponde à duração da fermentação realizada por cada estirpe, sendo a parte mais escura referente à fase de latência e a mais clara à de fermentação. As estirpes a sublinhado correspondem às isoladas a partir de amostras compostas. A linha horizontal tracejada indica a duração de fermentação realizada pela estirpe de referência. Os aromas identificados na prova organolética estão indicados no eixo vertical secundário, e os detetados em cada vinho encontram-se assinalados em cima da barra correspondente (●– descritor positivo; Δ– descritor negativo). (B) Os critérios enológicos estão sumariados numa representação esquemática em que cada linha corresponde a um fenótipo e cada coluna a uma estirpe (coincidente com a indicada no eixo do gráfico). Cada quadrado tem uma cor cujo significado se encontra apresentado na legenda. As estirpes excluídas no processo de avaliação da duração da fermentação e prova organolética foram marcadas com um padrão de riscas diagonais. As estirpes selecionadas, após avaliação dos restantes testes fenotípicos, foram assinaladas com uma seta (↓)..... **72**

Figura IV-6: Concentrações dos compostos químicos (etanol, glicerol, frutose, glucose e ácido acético) dos vinhos produzidos a partir de mosto da mistura de *Loureiro* e *Avesso* com as estirpes DR2, D3 e LQ2 e com a estirpe de referência (Lalvin QA23®)..... **75**

Figura V-1: (A) Perfil das fermentações efetuadas com as estirpes D3 e Lalvin QA23®, realizadas a 18 °C, em 50 L de um mosto de 2010 constituído pela mistura das castas *Loureiro* e *Avesso* e (B) concentrações dos compostos químicos (frutose, glucose, etanol, glicerol, ácido acético, ácido tartárico, ácido málico e ácido succínico) presentes nos vinhos obtidos no volume de 50 L em comparação com as concentrações observadas nos vinhos fermentados em 100 mL. **95**

Figura V-2: Comparação dos perfis de amplificação de sequências interdelta representativos dos isolados de levedura recolhidos no final das fermentações realizadas em diferentes mostos e/ou volumes, com os perfis obtidos a partir das estirpes inoculadas (M - marcador de peso molecular; C1 – estirpe Lalvin QA23® inoculada; C2 – estirpe D3 inoculada; A1 – *Loureiro*, 1000 L; B1 – *Batoca*, 5 L; 1 - *Sauvignon Blanc*, 50 L; 2 - *Alvarinho*, 50 L; 3 - *Loureiro*, 5 L, 1; 4 - *Loureiro*, 5 L, 2; 5 - *Loureiro*, 5 L, 3; 6 - *Batoca*, 5 L; 7 - *Cabernet Sauvignon*, 50 L; 8 - *Chardonnay*, 5 L; 9 - *Riesling*, 5 L; 10 - *Loureiro*, 50 L; 11 - *Loureiro* 500 L; 12 - *Merlot*, 50 L; 13 - *Syrah*, 50 L; 14 - *Touriga Nacional*, 50 L; 15 - *Loureiro*, 0,1 L, 1; 16 - *Loureiro*, 0,1 L, 2; 17 - *Loureiro*, 0,1 L, 3)..... **97**

Figura V-3: Perfil das fermentações realizadas em 2011 com a estirpe D3 em mosto da casta *Loureiro*, a 18 °C e em diferentes volumes (100 mL, 5L e 50 L), e a 16 °C em 500L (A); e comparação das concentrações dos compostos químicos (frutose, glucose, etanol, glicerol, ácido acético, ácido tartárico, ácido málico e ácido succínico) presentes nos vinhos obtidos nas diferentes condições (B). As barras de erro representam o desvio padrão da média das três réplicas independentes. **98**

Figura V-4: Perfil das fermentações realizadas com a estirpe D3 em mostos de diferentes castas de uvas brancas (*Batoca*, 5 L, *Chardonnay*, 5 L, *Gewurztraminer*, 5 L, *Riesling*, 5 L, *Sauvignon Blanc*, 50 L, *Loureiro*, 50 L, *Alvarinho*, 50 L), fermentadas a 18 °C (A), e mostos de diferentes castas de uvas tintas (*Merlot*, 50 L, *Syrah*, 50 L, *Touriga Nacional* 50 L, e *Cabernet Sauvignon*, 50 L), fermentadas a 25 °C (B). **100**

- Figura V-5:** Concentrações dos compostos químicos (frutose, glucose, etanol, glicerol, ácido acético, ácido tartárico, ácido málico e ácido succínico) presentes nos vinhos obtidos a partir das fermentações realizadas com a estirpe D3 em diferentes volumes de mostos de diversas castas (*Batoca*, 5 L, *Chardonnay*, 5 L, *Gewurztraminer*, 5 L, *Riesling*, 5 L, *Sauvignon Blanc*, 50 L, *Loureiro*, 50 L e 500 L, *Alvarinho*, 50 L, *Merlot*, 50 L, *Syrah*, 50 L, *Touriga Nacional* 50 L, e *Cabernet Sauvignon*, 50 L) e das fermentações realizadas com a estirpe Lalvin QA23® nos mostos das castas *Batoca* (5 L) e *Loureiro* (1000 L). **102**
- Figura V-6:** Concentração total dos compostos do aroma identificados em cada família, para os vinhos obtidos pela fermentação com as estirpes Lalvin QA23® e D3, dos mostos das castas *Loureiro* (2011), *Batoca* (2011), e mistura de *Loureiro* e *Avesso* (2010). **110**
- Figura V-7:** Análise sensorial dos vinhos obtidos pela fermentação do mosto de 2010, constituído pela mistura das castas *Loureiro* e *Avesso*, com a estirpe D3 em comparação com a Lalvin QA23®. **112**
- Figura VI-1:** Resultados dos testes fenotípicos, representados como percentagem de estirpes de cada região vitivinícola que: (A) são resistentes a diferentes concentrações de etanol e SO₂; e (B) são produtoras de H₂S, têm fenótipo *killer*, atividade β-glucosidásica e atividade galactosidásica. As classificações qualitativas utilizadas nos testes de produção de H₂S e atividade β-glucosidásica foram: sem produção/atividade, 0; baixa produção/atividade, 1; produção/atividade intermédia, 2, e produção/atividade elevada, 3, respetivamente. Nos meios seletivos com etanol, SO₂ e galactose, os sinais (+) / (-) assinalam se houve ou não crescimento. **134**
- Figura VI-2:** Valores médios (e respetivos desvios padrão) dos tempos de fermentação e dos principais metabolitos obtidos nas microfermentações (18 °C) dos mostos de *Loureiro* e *Avesso* e de *Touriga Nacional*, com as estirpes *S. cerevisiae* isoladas nas regiões do Alentejo (A), Porto e Douro (D), Vinhos Verdes (VV), Bairrada (B), Tejo (R) e Dão-Lafões (Da). Nos gráficos do tempo de fermentação, a parte cinza claro das barras representa o tempo de latência. As linhas horizontais a negrito correspondem ao valor médio de todas as regiões. **137**
- Figura AIII-1:** Valores do rácio A₂₆₀/A₂₈₀ do DNA obtido de 12 estirpes de *S. cerevisiae* e de outras 12 espécies de levedura, recorrendo aos métodos de extração com microtubos e com microplacas. **195**
- Figura AIII-2:** Resumo das fermentações realizadas pelas 64 estirpes de *S. cerevisiae* provenientes de seis regiões vitivinícolas, realizadas em mosto de Loureiro e Avesso e de Touriga Nacional. A parte mais clara das barras corresponde à fase de latência até ao começo da fermentação (número de dias até perda de massa de 2 g/L), e a parte mais escura corresponde à duração da fermentação (número de dias desde a perda de massa de 2 g/L até peso constante). A percentagem de estirpes de cada região que terminaram a fermentação está indicada no eixo horizontal de cada um dos gráficos. **196**

LISTA DE TABELAS

Tabela II-1: Características enológicas relevantes na seleção de estirpes vnicas de <i>Saccharomyces</i> , nomeadamente com impacto nas características tecnológicas gerais da vinificação, e na qualidade organoléptica e salubridade do vinho (OIV, 2012; Schuller and Casal, 2005).....	19
Tabela II-2: Volume de vinho produzido em 2014 nos dez principais países produtores (OIV, 2014b).....	26
Tabela II-3: Principais empresas produtoras de leveduras <i>starter</i> para aplicação enológica.....	27
Tabela III- 1: Tamanho dos alelos de microssatélites (bp) de seis estirpes de <i>S. cerevisiae</i>	48
Tabela IV- 1: Resumo do número estirpes de <i>S. cerevisiae</i> obtidas a partir dos isolados de levedura recolhidos no final das fermentações espontâneas, realizadas com várias castas de diferentes regiões vitivinícolas.	65
Tabela V-1: Composição do mosto, ano de colheita e condições de fermentação.	91
Tabela V-2: Rendimento de etanol (Y etanol) e rendimento de glicerol (Y glicerol) determinado nos vinhos obtidos a partir das fermentações realizadas com as estirpes D3 e Lalvin QA23 [®] , em mostos de diferentes castas e em diversas condições de volume e temperatura.	103
Tabela V-3: Teor médio (C) e desvio padrão dos compostos voláteis da fração livre do aroma dos vinhos obtidos pela fermentação com as estirpes Lalvin QA23 [®] e D3, dos mostos das castas <i>Loureiro</i> (2011), <i>Batoca</i> (2011), e mistura de <i>Loureiro</i> e <i>Avesso</i> (2010). Valor da atividade de odor (O.A.V.) dos compostos para os quais é conhecido o Limiar olfativo (L.O.), e os descritores aromáticos correspondentes.	105
Tabela V- 4: Concentração de tióis voláteis nos vinhos obtidos pela fermentação do mosto da casta <i>Loureiro</i> (2011) com as estirpes Lalvin QA23 [®] e D3, seus descritores aromáticos e limiar de percepção olfativa.....	111
Tabela VI-1: Características geoclimáticas e principais castas portuguesas recomendadas das regiões vitivinícolas portuguesas (Infovini, n.d.; IVV, n.d.; Wines of Portugal, n.d.).	126
Tabela VI-2: Designação das 64 estirpes de <i>S. cerevisiae</i> , regiões vitivinícolas e castas de onde foram isoladas.	130
Tabela VI- 3: Composição dos mostos de <i>Touriga nacional</i> e <i>Loureiro</i> e <i>Avesso</i> , utilizados nas microfermentações.	132
Tabela VI- 4: Resultados da análise da variância <i>one-way</i> ANOVA entre as seis regiões vitivinícolas (Alentejo-A, Porto e Douro -D, Vinhos Verdes-VV, Bairrada-B, Tejo-R e Dão-Da), para o tempo de fermentação e de latência e para os principais metabolitos obtidos nas microfermentações dos mostos de <i>Loureiro</i> e <i>Avesso</i> e de <i>Touriga Nacional</i> , e comparações múltiplas entre todos os pares de médias dos parâmetros com diferenças significativas (Tukey-Kramer).	139

Tabela AII- 1: Códigos atribuídos às 64 estirpes de *S. cerevisiae*, isoladas e caracterizadas no âmbito deste doutoramento em empresa, castas de uvas de onde foram obtidas e regiões vitivinícolas de origem..... **191**

LISTA DE PUBLICAÇÕES

Patentes

Vieira, E., Shuller, D., Casal, M., Araújo, I., 2015. *Saccharomyces cerevisiae* strain, EP 2 837 698 A1

URL: <https://register.epo.org/application?number=EP13724628>

Revistas científicas

Drumonde-Neves, J.*, Vieira, E.*, Lima, M.T., Araújo, I., Casal, M., Schuller, D., 2013. An easy, quick and cheap high-throughput method for yeast DNA extraction from microwell plates, *J.Microbiol.Methods*, 1-3.

(* contribuíram igualmente)

URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701213001115>

Livros de actas de congressos

Vieira, E., Drumonde-Neves, J., Machado, R., Silva, P., Gomes, A.C., Sousa, S., Ramos, P.T., Alemão, F., Lima, M.T., Araújo, I., Duarte, F.L., Santos, M.A., Casal, M., Schuller, D., 2010. A colecção de estirpes autóctones de *Saccharomyces cerevisiae* das principais regiões vitivinícolas Portuguesas, VIII Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo.

URL: <http://hdl.handle.net/1822/12029>

CAPÍTULO I

ENQUADRAMENTO GERAL

1 MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS

A indústria vitivinícola é um setor chave para a economia portuguesa. A globalização deste mercado tem colocado novos desafios às empresas vitivinícolas dos países tradicionais, onde se inclui Portugal. A concorrência internacional dos novos países produtores e a evolução dos gostos e tendências dos consumidores têm aumentado a preocupação dos produtores em obter vinhos diferenciados de qualidade. A perceção de qualidade por parte do consumidor está intrinsecamente ligada ao perfil sensorial do vinho. Por sua vez, as características sensoriais de um vinho são influenciadas por vários fatores (a casta, o *terroir*, o estado fitossanitário das uvas, os microrganismos presentes durante todo o processo fermentativo, ou ainda o armazenamento).

O vinho resulta da fermentação alcoólica de mostos de uva conduzida pelas leveduras. Estas convertem os açúcares em etanol, dióxido de carbono e outros metabolitos que têm impacto no perfil organolético do vinho. Quando ocorre espontaneamente, a vinificação é realizada pelas leveduras presentes na superfície das uvas ou no interior da adega. No entanto, como a dinâmica das fermentações espontâneas é frequentemente imprevisível e pode conferir características desagradáveis ao vinho, os produtores recorrem frequentemente a culturas *starter* de leveduras comerciais para conduzir a vinificação, assegurando assim o controlo do processo. Além do mais, quando são utilizados os mesmos *starters* de levedura, esta prática garante também que os vinhos produzidos mantêm a homogeneidade das características entre campanhas vitivinícolas. Existem cerca de duas centenas de *starters* de levedura comercialmente disponíveis, algumas com uma grande abrangência de utilização no que respeita ao tipo de vinho ou da casta de videira. Tem sido defendido que a utilização quase universal destas leveduras *starters* generalistas tem contribuído para uma uniformização e descaracterização dos vinhos, razão pela qual os enólogos e produtores de vinho têm demonstrado maior interesse por leveduras que contribuam para a diferenciação dos seus produtos. Neste contexto, existe um potencial considerável na exploração deste recurso biológico e da sua contribuição para a diversificação de vinhos.

A Vinalia é um *spin-off* do departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, fundada em 2006 com o propósito de fornecer soluções de biotecnologia para a viticultura e enologia. Este doutoramento realizou-se em ambiente empresarial, envolvendo a Vinalia e o departamento de Biologia da Universidade do Minho, e visou diversificar os produtos e serviços da empresa. Assim, um dos objetivos foi desenvolver um serviço inovador para o setor vitivinícola, implementando métodos rápidos e especializados, assentes na tipagem molecular de

leveduras vínicas. Outra finalidade deste doutoramento foi a seleção e caracterização de estirpes de leveduras isoladas de diversas origens geográficas e avaliar o seu potencial de aplicação para a produção de vinhos característicos dessas regiões vitivinícolas. Pretendeu-se ainda obter produtos biotecnológicos, em particular novas estirpes de leveduras, que contribuíssem para a produção de vinhos de elevada qualidade, que conferissem aos vinhos propriedades particulares.

2 ESTRUTURA DA TESE

Esta dissertação está dividida em nove capítulos. Os Capítulos III, IV, V e VI, foram escritos em formato de artigo, contendo cada um as seguintes secções: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão.

No presente capítulo (**Capítulo I**) contextualiza-se a motivação e os objetivos do doutoramento e apresenta-se a estrutura desta dissertação.

A Introdução geral deste trabalho, que corresponde ao **Capítulo II**, apresenta uma breve revisão bibliográfica sobre a diversidade de leveduras e a sua utilização em diferentes aplicações biotecnológicas, particularizando a análise da variabilidade genética e fisiológica das leveduras vínicas. É também realizada uma descrição do mercado global das leveduras para aplicação enológica a par do mercado global do vinho. São ainda referidas as principais tendências do mercado dos vinhos e, conseqüentemente, das leveduras que os produzem. Por fim, são revistas as abordagens para a seleção de novas estirpes de leveduras para aplicação enológica, em particular o recurso a estratégias de melhoramento sem recurso a técnicas se enquadram na definição de microrganismos geneticamente modificados (MGM).

O **Capítulo III** descreve o desenvolvimento e validação de um método rápido de extração de DNA de *Saccharomyces cerevisiae* e outras espécies de leveduras. Este método resultou da adaptação de um método anteriormente descrito, para um formato de microplacas de 96 poços. A miniaturização do método permitiu aumentar oito vezes o número de amostras processadas num dia de trabalho. O método otimizado foi validado para a utilização direta do DNA na amplificação por PCR e posterior análise de sequências interdelta, de *loci* de microssatélites e de regiões ITS ribossomais.

O **Capítulo IV** reporta o isolamento e genotipagem de estirpes *S. cerevisiae* a partir de amostras de uvas colhidas em seis regiões vitivinícolas portuguesas. É também descrito um

modelo simplificado de seleção de leveduras para aplicação em fermentações industriais, assim como a caracterização enológica das estirpes avaliadas durante esse processo. Em resultado deste trabalho foi selecionada uma estirpe (D3). Paralelamente é comparado o comportamento enológico de estirpes isoladas a partir de dois tipos de amostra (compostas e não compostas) com o objetivo de reduzir o número de estirpes envolvidas no processo de seleção.

Os testes à escala laboratorial utilizados nos processos de seleção de estirpes não reproduzem com exatidão as fermentações à escala industrial. Assim, o **Capítulo V** descreve o comportamento fermentativo da estirpe D3, selecionada no capítulo anterior, em vinificações à escala piloto e industrial. Estes ensaios foram realizados em diferentes mostos, oito de castas de uvas brancas e quatro de uvas tintas, nas condições tecnológicas geralmente utilizadas nos processos industriais. Em três das castas brancas foram efetuados ensaios em paralelo com uma levedura comercial (Lalvin QA23[®]).

As estirpes de *S. cerevisiae* apresentam uma grande variedade de características fenotípicas, que resultam muitas vezes da adaptação das populações a diferentes ambientes de modo utilizar todo o seu potencial. No **Capítulo VI** reporta-se a caracterização da diversidade fenotípica e enológica de seis populações de estirpes de *S. cerevisiae*, que correspondem aos isolados obtidos a partir de mostos das seis regiões vitivinícolas (Capítulo IV). Neste trabalho avaliou-se a capacidade das estirpes pertencentes à mesma população (provenientes da mesma região) partilharem algumas semelhanças fenotípicas. Pretendeu-se avaliar também se as interações entre as leveduras e as condições ambientais específicas de cada região favoreceram a ocorrência de estirpes mais adaptadas às condições vitivinícolas locais.

No **Capítulo VII** é apresentada uma discussão geral e as conclusões mais importantes deste doutoramento, terminando com sugestões para futuros trabalhos.

A lista das referências bibliográficas citadas ao longo da dissertação é apresentada no **Capítulo VIII**.

A par do trabalho de investigação desenvolvido neste doutoramento foram realizadas outras atividades para dinamizar a I&D da Vinalia, que se encontram descritas no **Anexo I**.

Os códigos das 64 estirpes de *S. cerevisiae*, isoladas e caracterizadas no âmbito deste doutoramento em empresa, encontram-se descritos no **Anexo II**.

No **Anexo III** encontram-se alguns dados complementares dos trabalhos desenvolvidos.

CAPÍTULO II

INTRODUÇÃO GERAL

1 PERSPETIVA HISTÓRICA

Desde a antiguidade que as bebidas e os alimentos fermentados têm contribuído para o avanço e sustentabilidade das sociedades humanas (Johnson and Echavarri-Erasun, 2011). Embora os povos da antiguidade não tivessem conhecimento do processo bioquímico designado por fermentação, utilizaram-no durante milhares de anos como uma maneira eficaz de preservar a qualidade de bebidas e alimentos (Sicard and Legras, 2011). As evidências mais antigas da produção de bebidas fermentadas datam do período neolítico, quando foram domesticados as primeiras plantas e animais, que forneceram a base para sociedades mais complexas e fixação permanente (McGovern et al., 2009). As análises químicas de compostos orgânicos absorvidos em antigos jarros de cerâmica da aldeia Jiahu, na China, revelaram a existência de uma bebida fermentada a partir de uma mistura de arroz, mel e frutas, datada de 7000 a. C. (McGovern et al., 2004). A primeira prova da produção de vinho aparece no norte da Mesopotâmia, num jarro datado de 5400-5000 a. C. onde foi detetado ácido tartárico (McGovern et al., 1996), e na Grécia, em Dikili Tash, foram encontrados restos da extração de sumo de uva, datados do final do quinto milénio a. C. (Valamoti et al., 2007). A descoberta de DNA ribossomal de *Saccharomyces cerevisiae* no resíduo de um dos jarros de vinho mais antigos encontrados no Egito, datados de 3150 a. C. (Cavaliere et al., 2003), sugere que esta espécie foi responsável pela fermentação desse vinho. Também em resíduos egípcios de pão e cerveja, datados de 1500-1300 a. C., foram observadas células de levedura, recorrendo à microscopia electrónica de varrimento (Samuel, 1996). Na época neolítica, as fermentações foram presumivelmente iniciadas por leveduras "selvagens", sendo provável que tenham existido trocas de leveduras entre alimentos e bebidas fermentadas (Sicard and Legras, 2011). As populações de leveduras associadas às tecnologias da fermentação acompanharam os seres humanos nos seus fluxos migratórios, supondo-se que se tenham expandido da Ásia, da Mesopotâmia e do Egito para o Velho Mundo (Legras et al., 2007; Sicard and Legras, 2011).

A ciência microbiana começou em meados do século XVII, com as primeiras observações microscópicas de células reportadas por Antonie van Leeuwenhoek. Entre 1836 e 1838, Cagniard-Latour, Kützing e Schwann, mostraram que a levedura é um ser vivo e Schwann identificou-a como um fungo. Ainda em 1838, Meyen criou o género *Saccharomyces* que compreendia as espécies *S. cerevisiae*, *S. pomorum* e *S. vini*, nomes que indicavam os locais onde tinham sido encontradas e que correspondiam à cerveja, à sidra e ao vinho, respetivamente (Barnett and Barnett, 2011). Em 1860, Pasteur descobriu que as leveduras eram

os agentes responsáveis por converter o açúcar em etanol e dióxido de carbono durante o processo fermentativo (Pasteur, 1860). Nos finais do século XIX, Koch e Hansen desenvolveram métodos que permitiram obter culturas puras de leveduras. Hansen, um microbiólogo que trabalhava no laboratório da cervejeira Carlsberg, conseguiu isolar quatro estirpes de *Saccharomyces* da cervejeira e identificou a que produzia consistentemente uma cerveja de boa qualidade. Em 1884 a Carlsberg produziu 200000 hL de cerveja usando culturas puras de levedura e, em poucos anos, este procedimento normalizou-se por todo o mundo (Barnett and Barnett, 2011). Delbrück e Hayduck aplicaram o método de Hansen para a obtenção de culturas puras para a panificação, e estiveram envolvidos no desenvolvimento de meios de crescimento de levedura em melaços e sais de amónio. Assim, no início do século XX a levedura de panificação foi propagada industrialmente (Barnett and Barnett, 2011). Também no início daquele século, o Instituto La Claire (França) começou a isolar, manter e produzir em pequena escala, culturas puras de leveduras que eram usadas no arranque de *pied de cuve*¹, que por sua vez eram utilizados para inocular mostos em fermentações industriais. No entanto, a produção industrial de leveduras para aplicação enológica, tal como a conhecemos hoje, começou apenas na década de 60, quando os produtores de leveduras da panificação começaram também a produzir leveduras vínicas (González et al., 2011). Desta forma, pode-se afirmar que a utilização comercial de culturas puras de leveduras, a par com o desenvolvimento e aplicação de práticas de assepsia, constituíram uma inovação importantíssima na indústria alimentar.

As técnicas desenvolvidas por Hansen levaram ao estabelecimento da taxonomia de leveduras e no final do século XIX já tinham sido publicadas descrições de cerca de 200 espécies (Barnett, 2004). Nessa época, começam a aparecer as primeiras coleções de culturas de microrganismos. A primeira coleção a fornecer serviços foi criada em 1890 pelo Prof. Král (Universidade Germânica de Praga) que, em 1900, publicou o primeiro catálogo de estirpes (Uruburu, 2003). Desde então muitas outras coleções têm sido criadas com o propósito de preservar e distribuir estirpes para os mais diversos fins (ensino, investigação, ensaios de controlo de qualidade, biotecnologia, etc.). Presentemente existem em todo o mundo numerosas coleções de culturas com milhares de estirpes depositadas como a American Type Culture Collection (ATCC) com 10000 estirpes, Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) com 7000, National Collection of Yeast Cultures (NCYC) com 4000, Portuguese Yeast Culture Collection (PYCC) com 2600, Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) com 2495, entre outras

¹ "pé de cuba": Inóculo preparado a partir de mosto, ao qual são adicionadas culturas puras de leveduras seleccionadas ou se deixa fermentar espontaneamente, e que tem o intuito de multiplicar essas leveduras para a subsequente adição às cubas de maior volume na produção de vinho.

(Boundy-Mills, 2012). Estas coleções de culturas de domínio público contêm apenas uma pequena parte das estirpes armazenadas, existem ainda muitas outras que são propriedade de organizações privadas do setor biotecnológico (Roberts and Oliver, 2011).

2 DIVERSIDADE DE LEVEDURAS E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

A levedura *S. cerevisiae* foi o primeiro microrganismo não bacteriano a ter o seu genoma nuclear conhecido. Em 1989, um grupo de investigadores liderados pelo biólogo belga André Goffeau, sequenciaram o cromossoma III e, em 1996, em resultado de um trabalho de investigação mundial, ficou completo o mapeamento dos restantes 15 cromossomas da levedura (Goffeau et al., 1996). A aplicação da análise de sequenciação, seguida de comparação de todo o genoma, permitiu a identificação precisa de espécies e esclareceu as relações entre os microrganismos. O desenvolvimento de um banco de dados (*barcode*) de sequências de genes facilmente determinadas dos domínios 1 e 2 (D1 / D2) da grande subunidade (LSU) de rRNA e do espaçador interno transcrito (ITS), permite agora a muitos laboratórios identificar as espécies de forma inequívoca (Kurtzman, 2014). Assim, a disponibilidade de novas técnicas na identificação de leveduras, que são agora relativamente baratas, simples e fiáveis, e as preocupações com as alterações ambientais, conduziram a uma tendência para isolar mais estirpes e para explorar novos nichos (Robert et al., 2006), duplicando o número de espécies de leveduras conhecidas durante a última década (Kurtzman, 2014).

O progresso na exploração de vários nichos ecológicos de leveduras tem revelado a grande diversidade de espécies que vivem nos diferentes *habitats* (Deak, 2009). Os solos (Botha, 2006; Sláviková and Vadkertiová, 2003; Yurkov et al., 2012), as florestas (Maksimova and Chernov, 2004; Pimenta et al., 2009), os oceanos (Bass et al., 2007; Le Calvez et al., 2009), os insetos (Nguyen et al., 2007; Suh et al., 2005; Urbina et al., 2013), as áreas agrícolas como, por exemplo, as vinhas (Gilbert et al., 2014; Pinto et al., 2014; Setati et al., 2012; Zarraonaindia et al., 2015), entre outros, são alguns exemplos de ecossistemas que têm sido pesquisados e caracterizados. Mas o mais surpreendente da exploração da diversidade das leveduras tem sido o conhecimento da vasta gama de condições fisiológicas em que estas crescem, em particular os ambientes extremos que se pensava inabitáveis. Têm sido descobertas leveduras extremófilas em diversos nichos, uns naturais e outros que resultam da ação humana. Existem leveduras capazes de crescer em ambientes muito secos, designadas de xerófilas, como as espécies do género *Cryptococcus* que habitam nas elevadas montanhas desérticas do East Pamir. As células destas leveduras possuem uma cápsula polissacarídea envolvente que é

impermeável e permite a sua sobrevivência neste local onde se observam oscilações bruscas de temperatura e humidade ao longo do dia (Aksyonov, 2002; Raspor and Zupan, 2006). Nos ambientes gelados, como os pólos Ártico e Antártico e as regiões alpinas, têm sido isoladas leveduras do solo, dos lagos, do gelo derretido, entre outros tipos de amostras. As leveduras que têm uma temperatura ótima de crescimento baixa (15 °C) e temperatura de crescimento máxima de 20 °C e mínima de 0 °C ou inferior, são chamadas de psicrófilas. Exemplos de leveduras psicrófilas são as espécies dos géneros *Mrakia* e *Mrakiella*, *Dioszegia antarctica*, *Dioszegia cryoxerica*, *Glaciozyma martinii* e *Glaciozyma watsonii* (Connell et al., 2010; Tsuji et al., 2015; Turchetti et al., 2011). As que crescem a 0 °C mas têm temperatura ótima de crescimento de 20 a 40 °C, designam-se de psicrotolerantes e são exemplos as espécies de leveduras dos géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Hanseniaspora* e *Saccharomyces* (Cavicchioli and Torsten, 2000; Raspor and Zupan, 2006). Também nas salinas e nos alimentos salgados têm sido isoladas leveduras, designadas de halófilas, se crescem em concentrações de NaCl superiores a 0,2 M, ou de halófilas extremas, se forem capazes de crescer em concentrações de NaCl superiores a 3,0 M (Cavicchioli and Torsten, 2000). *Debaryomyces hansenii* é uma levedura halófila que se encontra em águas marinhas pouco profundas e em alimentos salgados, e que consegue acumular elevadas concentrações de Na⁺ ou K⁺ (González-Hernández et al., 2004). As salinas, que têm concentrações de NaCl entre 3 e 35%, são o *habitat* natural de algumas leveduras como *Hortaea werneckii*, *Phaeotheca triangularis* e *Trimmatostroma salinum* (Gunde-Cimerman et al., 2000; Kogej et al., 2005). Também existem leveduras capazes de se desenvolverem em ambientes com elevadas concentrações de açúcar, como o mel. Estas leveduras, designadas de osmófilas, pertencem aos géneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Nematospora*, *Oosporidium*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces*, *Schwanniomyces*, *Trichosporan* e *Zygosaccharomyces* (Snowdon and Cliver, 1996). As leveduras acidófilas são as que crescem em ambientes com baixo pH, embora o seu pH intracelular permaneça próximo da neutralidade (Raspor and Zupan, 2006). Exemplos destes ambientes são fontes de águas sulfurosas, efluentes de mineração, águas residuais industriais, solos arenosos ácidos (Gadanhó et al., 2006; Gross and Robbins, 2000) ou até mesmo o estômago de animais domésticos -a estirpe *Candida slooffii* CBS 4068 foi isolada do estômago de um suíno (Arthur and Watson, 1976). Espécies como *Cryptococcus humicolus*, *Cryptococcus laurentii*, *Leucosporidium scottii*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Rhodotorula cresolica*, *Rhodotorula mucinaginosa*, *Schizoblastosporion starkeyi-henricii*, *Trichosporon dulcimum*, têm comportamento acidófilico (Gross and Robbins, 2000). Na faixa piritosa ibérica, a drenagem ácida das rochas origina habitats aquáticos com baixo pH e elevadas concentrações de metais

pesados. Foram isoladas destas águas espécies de leveduras pertencentes aos géneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Lecytophora* e as espécies *Candida fluvialilis*, *Rhodospidium toruloides* e *Williopsis californica* (Gadanh et al., 2006). Existem ainda leveduras que resistem em ambientes com elevadas concentrações de Zn(II) e o Cr(III) (*Yarrowia lipolytica* e *Arthroascus javanensis*), de Zn(II) e de Cr(VI) (*S. cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*), de alumínio e de manganês (*Rhodotorula glutinis*), entre outros (Raspor and Zupan, 2006). Também foi reportado que o 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) pode ser transformado por espécies dos géneros *Saccharomyces*, *Candida*, e *Hansenula* (Zaripov et al., 2002) e pela *Y. lipolytica*, que também degrada hidrocarbonetos e triglicéridos (Jain et al., 2004; Ziganshin et al., 2007).

Estas leveduras capazes de se desenvolverem em ambientes extremos têm atraído a atenção, não apenas pelo desafio que colocam às noções atuais de limites de sobrevivência e de contributo para a diversidade microbiana, mas também devido ao seu potencial biotecnológico (González-Toril, 2003).

Em 2011 existiam aproximadamente 1500 espécies de leveduras conhecidas (Kurtzman et al., 2011), distribuídas por dois dos sete filos de fungos, o Ascomycota e o Basidiomycota. No entanto, estima-se que se tenha descoberto apenas 1 a 5% das espécies de leveduras existentes (Boekhout, 2005; Deak, 2009). As leveduras, ascomicetes ou basidiomicetes, são fungos unicelulares que se caracterizam por se reproduzirem assexualmente por gemulação ou fissão, e têm estados sexuais que não são fechados em corpos de frutificação (Kurtzman et al., 2011). A maioria das espécies conhecidas, como a *S. cerevisiae*, pertence ao filo Ascomycota, uma vez que em condições adversas ao crescimento vegetativo apresenta um estado sexual caracterizado pela formação de ascos e ascósporos (Kurtzman, 2014; Suh et al., 2006). As restantes espécies incluem-se no filo Basidiomycota, dado gerarem um estado sexual caracterizado por basídios com basidiósporos (Kurtzman, 2014; Suh et al., 2006). Existem outras grandes diferenças entre estes dois grupos de leveduras (Suh et al., 2006): (i) a composição polissacarídea da parede celular é dominada por quitina nos basidiomicetes e por β -glucanos nos ascomicetes; (ii) a composição de DNA nuclear em guanina e citosina (G + C) tende a ser superior a 50% nos basidiomicetes e inferior a 50% nos ascomicetes (Kurtzman and Fell, 1998); (iii) a formação de gémulas é tipicamente enteroblástica nos basidiomicetes e holoblástica nos ascomicetes; (iv) as leveduras ascomicetes são geralmente mais fermentativas, mais copiotróficas (isto é, encontram-se em ambientes ricos em nutrientes, particularmente carbono) e, ao mesmo tempo nutricionalmente especializadas, ao contrário das espécies basidiomicetes

que tendem a usar uma ampla gama de compostos de carbono de forma mais eficiente e em concentrações mais baixas (Kurtzman and Fell, 1998); e (iv) os ascomicetes são encontrados em nichos especializados, normalmente líquidos e ricos em carbono orgânico, que envolvem interações com plantas e insetos ou outros animais invertebrados e que deles dependem para a sua dispersão, em contraste com os basidiomicetos que parecem estar adaptados para a colonização de superfícies sólidas, pobres em nutrientes, e frequentemente não recorrerem a animais como vetores para a sua dispersão (Lachance and Starmer, 1998).

As diferentes características destes dois grupos podem conferir aptidões diversas que se refletem nas suas aplicações biotecnológicas. As leveduras ascomicetes são particularmente importantes nas fermentações de alimentos e bebidas alcoólicas, na produção heteróloga de proteínas e enzimas, de *single-cell protein* (SCP)², de rações e forragens, e ainda como organismos modelo na investigação fundamental (Johnson, 2013a). Por seu lado, as leveduras basidiomicetes são utilizadas preferencialmente na produção de enzimas utilizadas na síntese química e farmacêutica, na produção de determinadas classes de metabolitos primários e secundários (tais como terpenóides e carotenóides), no catabolismo aeróbio de fontes de carbono complexas, e na biorremediação de poluentes ambientais (Johnson, 2013a).

Presentemente as leveduras têm muitas aplicações biotecnológicas para além das fermentações tradicionais de alimentos e bebidas (Figura II-1), características descritas de uma forma pormenorizada por alguns autores (Chambers et al., 2009a; Deak, 2009; Johnson and Echavarri-Erasun, 2011) e que incluem a produção de biocombustíveis, de ingredientes para alimentação e para rações, de compostos nutracêuticos e farmacêuticos, de hormonas e vacinas, são utilizadas como probióticos, agentes para controlo biológico de pragas, na biorremediação e continuam a ser um microrganismo modelo na investigação biológica fundamental e biomédica.

A diversificação das aplicações biotecnológicas tem sido realizada apenas com um número reduzido de espécies de leveduras, comparativamente à totalidade de espécies conhecida (Deak, 2009). Embora as leveduras designadas de não-convencionais (não-*Saccharomyces*) contribuam significativamente para estes processos, como por exemplo as espécies, *S. pombe*, *Scheffersomyces stipitis*, *Y. lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *D. hansenii*, *R. glutinis*, *Komagataella (Pichia) pastoris*, *Candida maltosa*, *Pseudozyma (Candida) antarctica*, a

² "SCP": Biomassa ou proteína extraída a partir de culturas de leveduras que pode ser usada como ingrediente ou como substituto em alimentos ricos em proteínas, tanto em alimentos como rações.

mais usada em processos industriais continua a ser *S. cerevisiae* (Steensels et al., 2014), superando outros grupos de microrganismos industriais em produtividade e receitas económicas (Johnson, 2013b). As suas aplicações na indústria incluem as fermentações tradicionais de alimentos e bebidas (cerveja, sidra, vinho, bebidas destiladas, panificação, queijos ou molhos), a produção de bioetanol, de SCP, de rações, de enzimas, de pequenos metabolitos de baixo peso molecular, de compostos heterólogos como a insulina e as vacinas da hepatite e do papiloma vírus, entre outros (Hou et al., 2012; Johnson, 2013b).

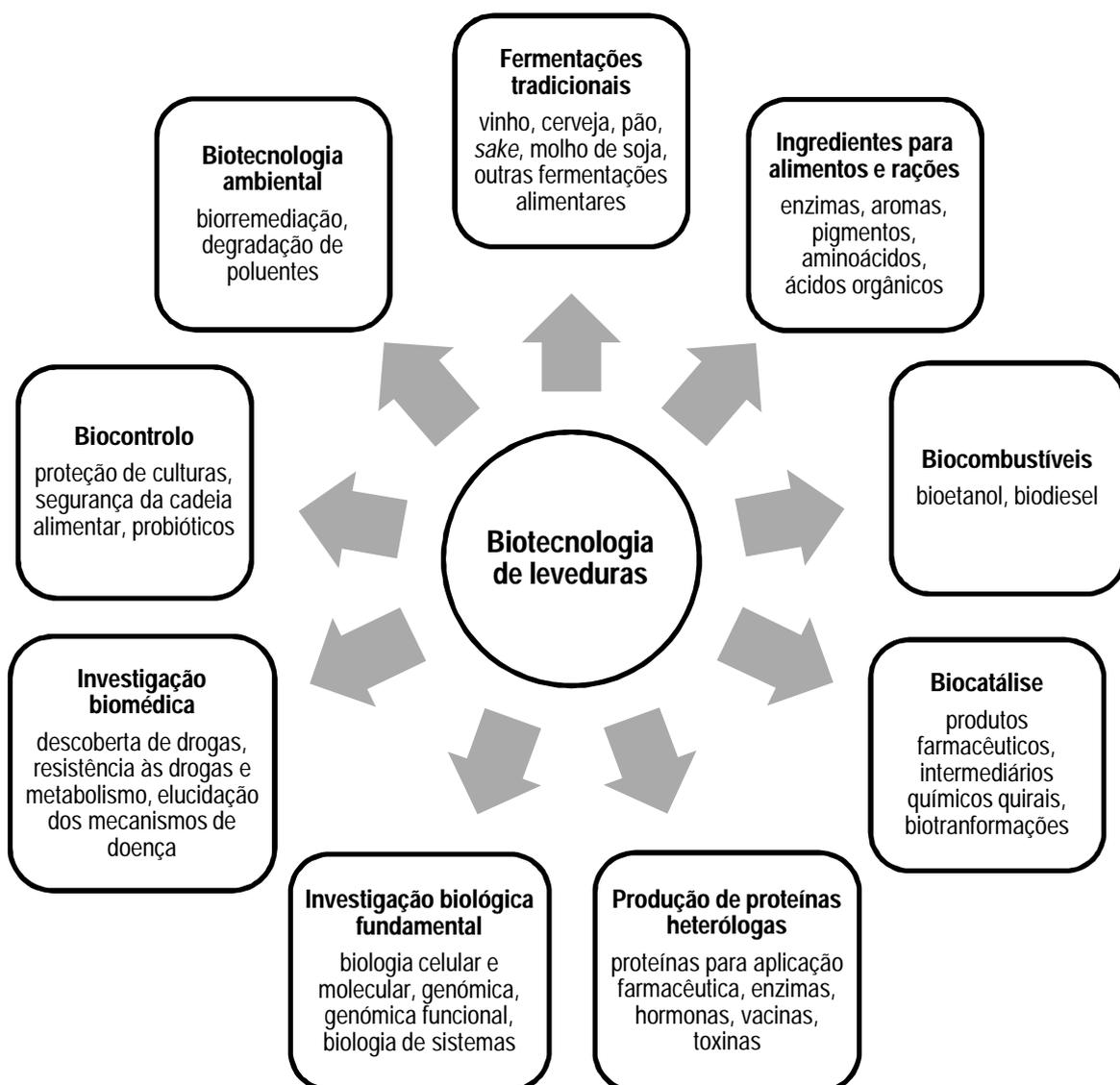


Figura II-1: Áreas de aplicação da biotecnologia de leveduras (adaptado de Johnson, 2013a).

3 EVOLUÇÃO E DIVERSIDADE DE *S. CEREVISIAE*

As estirpes industriais de *S. cerevisiae* são organismos muito especializados, que evoluíram para utilizar todo o potencial dos diferentes ambientes ou nichos ecológicos fornecidos pela atividade humana, num processo de seleção que pode ser descrito como “domesticação”, análogo ao processo de seleção agrícola (Bauer and Pretorius, 2000). Aliás, a abundância de estirpes de *S. cerevisiae* associadas a bebidas fermentadas e a dificuldade em obter isolados em *habitats* como o solo das vinhas e a superfície das uvas, levou a que esta espécie fosse sugerida como o primeiro ser domesticado (Martini, 1993; Vaughan-Martini and Martini, 1995).

Os avanços recentes nas tecnologias de sequenciação de nova geração (NGS), que devido à sua enorme capacidade de sequenciação em paralelo têm a vantagem de gerar grandes quantidades de dados (Metzker, 2010), permitiram mapear a diversidade genética com um nível de detalhe sem precedentes. Estudos de genómica populacional em larga escala forneceram informações que elucidaram a história evolutiva da espécie *S. cerevisiae* (Liti, 2015). A análise de estirpes isoladas em diferentes continentes e a partir de diversos nichos ecológicos, mostrou que os isolados de ambientes vitivinícolas formam um grupo geneticamente diferenciado e distinto dos obtidos em nichos naturais e em ambientes associados ao processo fermentativo do *sake*, sugerindo eventos de domesticação independentes (Fay and Benavides, 2005; Schacherer et al., 2009). Estas estirpes vínicas não estão circunscritas a fronteiras geográficas, uma vez que os isolados da Europa, Austrália, Chile e Nova Zelândia partilham o mesmo ancestral recente e refletem a história da migração humana (Dunn et al., 2012; Goddard et al., 2010; Legras et al., 2007; Liti, 2015; Liti et al., 2009). Por outro lado, as linhagens de estirpes que não estão associadas a atividades humanas parecem ser características de determinadas áreas geográficas (Liti, 2015). Um estudo recente realizado com estirpes de *S. cerevisiae* obtidas em várias regiões da China revelou que os isolados das florestas primitivas, onde a atividade humana é praticamente inexistente, ocorrem linhagens muito antigas e significativamente diversas, demonstrando que existem populações independentes de estirpes selvagens de *S. cerevisiae* que são mais antigas que os isolados domesticados (Wang et al., 2012). Estes resultados sugerem que a China possui um reservatório natural de variação genética de *S. cerevisiae*, indicando que esta espécie é muito provavelmente originária da Ásia (Liti, 2015; Wang et al., 2012). Este estudo revela ainda que a diversidade natural da espécie *S. cerevisiae* é enorme e maioritariamente inexplorada, uma vez que só em Hainan, uma ilha tropical no sul da China onde existem florestas primitivas, a magnitude da diversidade genética

da população de *S. cerevisiae* é equivalente à diversidade de toda a população humana (Wang et al., 2012).

4 CARACTERÍSTICAS ENOLÓGICAS DAS LEVEDURAS VÍNICAS: DIVERSIDADE INTRA-ESPECÍFICA DE *S. CEREVISIAE*

Nas fermentações industriais, as condições fisiológicas a que as leveduras estão sujeitas são muitas vezes diferentes das suas condições ótimas de crescimento, pelo que a sua capacidade de adaptação a alterações ambientais determina a sua utilidade nas diferentes aplicações biotecnológicas (Randez-Gil et al., 2013). Este atributo é particularmente importante nas estirpes de leveduras vínicas uma vez que as características físico-químicas do mosto (o pH baixo, a elevada osmolaridade), as condições de fermentação (a temperatura, a adição de dióxido de enxofre, a clarificação) e a evolução do meio ao longo da fermentação (o aumento da concentração de etanol, a depleção de nutrientes), tornam o ambiente extremamente adverso para a maioria dos microrganismos (Bauer and Pretorius, 2000; Rossouw et al., 2009). As estirpes de leveduras vínicas industriais da espécie *S. cerevisiae* são um grupo de microrganismos geneticamente e fenotipicamente diverso, que se adaptou às especificidades do ambiente enológico (Rossouw et al., 2012a). A maioria das estirpes de leveduras vínicas comercialmente disponíveis foram selecionadas pelas suas características tecnológicas e enológicas positivas, e são presentemente muito utilizadas uma vez que contribuem para o controlo do processo fermentativo e para a qualidade do vinho.

Cada estirpe possui um conjunto exclusivo de características enológicas e a relevância de cada uma varia de acordo com o tipo e estilo de vinho a produzir (OIV, 2012; Regodon et al., 1997). Assim, a diversidade fenotípica das estirpes de *S. cerevisiae* tem sido explorada em programas de seleção direcionados para a melhoria das características sensoriais dos vinhos e conferindo atributos típicos a vinhos específicos (Mendes et al., 2013). O ponto de partida destes programas é sempre a seleção clonal de estirpes isoladas em ambientes naturais pertencentes a áreas de viticultura de interesse (Schuller and Casal, 2005).

Os critérios para a seleção de leveduras vínicas têm evoluído ao longo dos anos (Mannazzu, I., Clementi, F. and Ciani, 2002; Pretorius and Bauer, 2002; Rainieri and Pretorius, 2000; Schuller and Casal, 2005; Suárez-Lepe and Morata, 2011). Tradicionalmente, a seleção das estirpes de leveduras vínicas era efetuada em função do seu poder fermentativo, da tolerância a elevadas concentrações de etanol, de apropriadas cinéticas fermentativas a

diferentes temperaturas, da produção de baixos teores de ácido acético e da resistência ao dióxido de enxofre (OIV, 2012; Suárez-Lepe and Morata, 2011). De facto, é essencial que as leveduras vínicas realizem fermentações rápidas, vigorosas e completas, consumindo todos os açúcares presentes no mosto e produzindo etanol em concentrações superiores a 8% (v/v). Devem também resistir às concentrações de dióxido de enxofre geralmente adicionadas ao mosto, para prevenir oxidações e contaminações microbianas. É ainda conveniente que apresentem uma distribuição uniforme no mosto em fermentação, produzam pouca espuma e sedimentem rapidamente no final da vinificação. Estas características devem ser observadas a baixas temperaturas (e.g. 15 °C) para vinificações de castas brancas e a temperaturas mais elevadas (e.g. 25 °C) para fermentações de castas tintas (Fleet, 2008).

O conhecimento da vasta influência das leveduras nas propriedades sensoriais do vinho acrescentou novos critérios de seleção, e agora são procuradas leveduras que podem melhorar não só as propriedades tecnológicas mas também as características sensoriais dos vinhos (Suárez-Lepe and Morata, 2011). Mais concretamente, é essencial que as leveduras produzam uma gama de metabolitos do aroma equilibrados (e.g. ésteres, álcoois superiores, ácidos gordos) e baixas concentrações de compostos voláteis indesejáveis (e.g. ácido acético, acetato de etilo, sulfureto de hidrogénio e dióxido de enxofre). Adicionalmente, as leveduras devem produzir enzimas que transformam compostos não voláteis precursores de aromas em compostos voláteis (e.g. monoterpenos, tióis) (Lambrechts and Pretorius, 2000; Styger et al., 2011; Ugliano and Henschke, 2009). Existem outros metabolitos gerados durante a fermentação que, embora não tenham impacto no aroma, contribuem para as características sensoriais, como por exemplo: os polióis glicerol e 2,3 – butanodiol, que conferem suavidade e corpo (Lambrechts and Pretorius, 2000; Scanes et al., 1998); e o acetaldeído e o ácido pirúvico, que reagem com as antocianinas para formar pigmentos estáveis (vitisinas), contribuindo para a estabilidade da cor (OIV, 2012; Suárez-Lepe and Morata, 2011).

Neste contexto, a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) compilou na resolução OIV-OENO 370-2012 vários critérios - tecnológicos, organoléticos e de salubridade - para orientar o processo de isolamento e seleção de leveduras do género *Saccharomyces*, para aplicação na produção de vinho (Tabela II-1).

Para além dos critérios previstos na resolução do OIV, as empresas produtoras de leveduras para a indústria vínica também têm requisitos que devem incluídos no processo de

Tabela II-1: Características enológicas relevantes na seleção de estirpes vínicas de *Saccharomyces*, nomeadamente com impacto nas características tecnológicas gerais da vinificação, e na qualidade organoléptica e salubridade do vinho (OIV, 2012; Schuller and Casal, 2005).

Propriedades enológicas		Descrição	Comportamento desejável
Características tecnológicas que influenciam a Vinificação	Poder de fermentação	É a quantidade máxima de açúcar que a estirpe é capaz de fermentar.	Fermentação completa de mostos contendo aproximadamente 200-300 g/L de açúcar.
	Vigor da fermentação e cinéticas a diferentes temperaturas	O vigor fermentativo é a velocidade a que a levedura inicia a fermentação (expresso em gramas de CO ₂ produzido 2 a 3 dias após o início da fermentação). A cinética de fermentação é a evolução, ao longo do tempo, do CO ₂ produzido (g) ou do açúcar fermentado (g).	Rapidez no arranque da fermentação; ausência de picos em consequência de variações de temperatura e bom desempenho durante o final da fermentação
	Tolerância ao dióxido de enxofre	É a concentração máxima de dióxido de enxofre (SO ₂), agente antimicrobiano e antioxidante utilizado frequentemente no processo fermentativo, que não afeta significativamente a capacidade de fermentação das leveduras.	Fermentação completa na presença das concentrações de SO ₂ usualmente aplicadas na vinificação (30 mg/L SO ₂ livre e 50 mg/L SO ₂ total são adequadas; concentrações até 100-150 mg/L SO ₂ são recomendadas).
	Resistência ao cobre	É a capacidade das leveduras para fermentarem na presença de elevadas concentrações de cobre (20 a 500 µmol/L), que pode estar presente no mosto e no vinho em resultado do uso de sulfato de cobre no combate de doenças criptogâmicas na vinha.	Fermentação completa na presença de concentrações elevadas de cobre e eventual capacidade para reduzir o seu teor.
	Fenótipo <i>Killer</i> (K e N)	É a característica que algumas estirpes possuem para produzir toxinas (K) que são letais para as estirpes sensíveis, ou que, embora não as produzam, são neutras à sua presença (N).	Fenótipo <i>K</i> ou <i>N</i> (pode facilitar a implantação da estirpe durante a vinificação).
	Modo de crescimento em meio líquido	É uma característica que depende da hidrofobicidade da parede celular da estirpe, que pode ter crescimento disperso ou em flocos.	Crescimento disperso durante a fermentação e rápida sedimentação no final.
	Produção de espuma	Esta característica varia em função da hidrofobicidade da parede celular da estirpe.	Pouca produção de espuma.
	Capacidade para fermentar mostos muito clarificados e com baixos teores de azoto assimilável (brancos)	É a aptidão da estirpe para fermentar mostos muito clarificados, que são utilizados desta forma para aumentar a produção de ésteres.	Assegurar uma fermentação completa com uma concentração de cerca de 100 mg/L de azoto assimilável.
	Comportamento no final da fermentação de mostos ricos em açúcares e resistência ao <i>stress</i> durante a fermentação (tintos)	A monitorização da cinética de fermentação de mostos com elevadas concentrações de açúcar permite avaliar o impacto que o efeito sinérgico da toxicidade causada pelo etanol e da falta de nutrientes essenciais têm no desempenho fermentativo da estirpe.	Assegurar a fermentação completa de mostos com elevadas concentrações de açúcar, que resultam em vinhos contendo 14,5-15,5% (v/v) de etanol.

Tabela II-1: Continuação.

	Propriedades enológicas	Descrição	Comportamento desejável
Características tecnológicas que influenciam a Vinificação	Autólise das leveduras e liberação dos polissacáridos presentes na parede celular (tintos)	É uma propriedade que depende das características da parede celular e que influencia a estabilidade coloidal e a cor.	Elevadas taxas de autólise e liberação de polissacáridos.
	Produção de polióis (tintos)	O teor de polióis metabolizados pela levedura tem um impacto importante na estrutura e suavidade do vinho.	Produção significativa de 2,3-butanediol.
	Baixa adsorção de antocianinas pela parede celular (tintos)	A adsorção de antocianinas varia em função da natureza polar das mesmas e da estrutura da parede celular.	Baixa taxa de adsorção de antocianinas.
	Produção de acetaldeído e de ácido pirúvico para aumentar a produção de vitisinas (tintos)	As vitisinas são pigmentos muito estáveis produzidos durante a fermentação por reações de condensação envolvendo metabolitos como o acetaldeído e o ácido pirúvico.	Produção de taxas ótimas de acetaldeído e de ácido pirúvico, que demonstrem aumentar a produção de vitisinas.
	Estirpes hidroxicinamato descarboxilase positivas para aumentar a formação de piranoantocianinas vinil-fenólicas (tintos)	As piranoantocianinas vinil-fenólicas são pigmentos com propriedades similares às vitisinas produzidas durante a fermentação por reações de condensação envolvendo vinil-fenóis, que são formados por ácidos hidroxicinâmicos. Estes ácidos são produzidos por estirpes de <i>Saccharomyces</i> que têm a enzima hidroxicinamato descarboxilase.	Atividade hidroxicinamato descarboxilase positiva para aumentar a produção destes pigmentos.
	Atividade β -glucosidásica (tintos)	A atividade β -glucosidásica extracelular pode influenciar a estabilidade da cor em resultado da hidrólise das antocianinas em angliconas, que são muito mais instáveis.	Atividade β -glucosidase negativas (vinhos tintos).
Características que influenciam a qualidade organoléptica	Produção de acidez volátil	O ácido acético, principal componente da acidez volátil, é um subproduto da fermentação que quando está presente em concentrações elevadas causa defeitos no vinho, nomeadamente odores considerados negativos.	Produção de baixos teores de ácido acético.
	Produção de glicerol	O glicerol é, a seguir ao etanol, o subproduto da fermentação com concentração mais elevada, e influencia a estrutura do vinho, aumentando a sua densidade e suavidade.	Produção de quantidades significativas de glicerol (vinhos tintos).
	Produção de álcoois superiores	Estes álcoois são metabolizados durante a fermentação e influenciam o aroma do vinho positivamente se estiverem presentes em baixas concentrações e negativamente em concentrações elevadas (>350 mg/L).	Produção de quantidades de álcoois superiores inferiores a 300 mg/L (vinhos tintos) ou 400 mg/L (vinhos brancos jovens).
	Produção de acetaldeído	Elevadas quantidades de acetaldeído no vinho são desfavoráveis, estando a sua presença nos vinhos brancos associada à oxidação. No entanto pode acrescentar complexidade ao aroma nos vinhos tintos (<100 mg/L) e nos vinhos envelhecidos.	Produção de quantidades inferiores a 100-125 mg/L.

Tabela I-1: Continuação.

Propriedades enológicas		Descrição	Comportamento desejável
Características que influenciam a qualidade organolética	Produção de ésteres	Estes compostos metabolizados durante a fermentação têm influência no aroma do vinho.	A produção desejável de ésteres varia em função das castas vinificadas: concentrações elevadas em castas de aromas neutros e baixas em castas aromáticas terpénicas.
	Produção de compostos voláteis de enxofre (sulfito de hidrogénio e mercaptanos)	Estes compostos voláteis resultam dos subprodutos do metabolismo do enxofre da levedura durante a fermentação e são considerados desagradáveis.	Produção de quantidades mínimas de dióxido de enxofre e de mercaptanos.
	Atividade sobre o ácido málico	Durante a fermentação, o ácido málico pode ser produzido ou degradado, e essa característica pode ser utilizada para equilibrar a acidez de alguns vinhos.	Degradação do ácido málico em mostos de elevada acidez e baixo pH e produção de ácido málico em mostos de baixa acidez e elevado pH.
	Atividades enzimáticas	Os precursores dos aromas terpénicos estão presentes sob a forma de conjugados glicosídeos e são as enzimas produzidas pelas leveduras que catalisam as reações que os transformam em compostos voláteis.	Actividade β -glucosidásica e β -xilosidásica positivas (vinhos brancos jovens).
Características que influenciam a salubridade	Produção de etilcarbamato	A ocorrência deste composto, tóxico e carcinogénico, em vinhos está relacionada com a atividade microbiana, a determinados valores de pH e certas concentrações de precursores azotados.	Controlo dos níveis deste composto utilizando estirpes seleccionadas.
	Produção de aminas biogénicas	Estes compostos podem ocorrer nos vinhos através da descarboxilação de aminoácidos por parte dos microrganismos, e dependendo da concentração e da sensibilidade individual, produzem um efeito tóxico que causa geralmente dores de cabeça e outros efeitos adversos.	Caracterização da predisposição para produzir aminas biogénicas.
	Atividade das leveduras sobre a ocratoxina A (OTA)	A OTA é uma micotoxina tóxica e potencialmente carcinogénica, que se encontra no vinho em consequência da atividade metabólica dos bolores presentes nas uvas. A CE fixou um valor máximo residual de 2 μ g/L em vinhos.	Capacidade de redução do conteúdo de OTA no vinho.
	Produção de metanol	A ocorrência do metanol no vinho resulta da degradação da parede das células das uvas por actividades enzimáticas.	Produção de concentrações inferiores a 150 mg/L.

seleção (Degre, 1993). A levedura deve ser passível de cultivo em larga escala e em substratos relativamente baratos (e.g. melão), uma vez que o custo de produção deve ser baixo de modo que o produto final seja acessível para a indústria. Para além disso, é necessário que a levedura tolere a secagem, a embalagem, o armazenamento e a reidratação (Soubeyrand et al., 2006), sem perda das propriedades enológicas que a caracterizam.

5 AS BASES GENÉTICAS DA DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE *S. CEREVISIAE*

A espécie *S. cerevisiae* é a mais notável do grupo de *Saccharomyces sensu stricto*, que é atualmente constituído por sete espécies: *S. paradoxus*, *S. cerevisiae*, *S. mikatae*, *S. arboricolus*, *S. kudriavzevii*, *S. eubayanus* e *S. uvarum*. Do ponto de vista evolutivo, as espécies *S. uvarum* e *S. eubayanus* são os membros mais basais deste complexo, enquanto a divisão entre *S. paradoxus* e *S. cerevisiae* é a mais recente (Borneman and Pretorius, 2015). A análise fenotípica de estirpes de *S. cerevisiae* em larga escala, revelou que esta espécie apresenta uma maior plasticidade fenotípica do que as estirpes de outras espécies do complexo *Saccharomyces stricto sensu* (Warringer et al., 2011). Por exemplo, relativamente à *S. paradoxus*, a espécie mais próxima da sua, *S. cerevisiae* apresentou uma diversidade fenotípica intra-específica 60% superior, apesar da sua variação genética ser mais limitada. O mesmo estudo mostrou também que, ao invés da sua origem ambiental, é a história das populações de *S. cerevisiae* que exerce maior influência nas suas características fenotípicas (Warringer et al., 2011), o que reflete a influência da atividade humana, pela qual os *stresses* impostos pelas várias fermentações foram selecionando inadvertidamente estirpes com mutações raras e com grande impacto fenotípico (Borneman and Pretorius, 2015).

Um tema central na biologia é perceber como a variação genética influencia a diversidade fenotípica, bem como de que forma esta variação é moldada pelos processos evolutivos (Bergström et al., 2014). Embora a variação fenotípica seja principalmente resultado da acumulação gradual de polimorfismos nucleotídicos simples (SNP's) ao longo do genoma (Bergström et al., 2014), as associações entre o fenótipo e o genótipo podem estender-se a outras formas de variação estrutural, como o conteúdo genómico e a variação do número de cópias (CNV), e de ploidia (Bergström et al., 2014; Liti, 2015). Estudos recentes mostraram que os subtelómeros, embora representem apenas aproximadamente 8% do genoma, são as principais regiões para a evolução funcional, sendo quase exclusivamente os sítios para a variação estrutural, do conteúdo genómico e da variação do número de cópias (CNV), e têm

maior propensão para variantes de perda de função (Bergström et al., 2014; Cubillos et al., 2011; Dunn et al., 2012). Certas formas de variação não-genética, como os priões, também podem ser determinantes na variação fenotípica. Os priões são proteínas que têm capacidade de adotar múltiplas conformações estáveis, e que atuam como elementos epigenéticos de heritabilidade (Halfmann et al., 2012; Jarosz et al., 2014). Também o ruído na transcrição celular ou nos processos de tradução (estocasticidade), o ciclo celular, o envelhecimento celular e a regulação epigenética, originam individualidade fenotípica (Avery, 2006; Kaern et al., 2005; Roberts and Oliver, 2011).

As características de interesse enológico são complexas. Em *S. cerevisiae*, estas são na sua maioria quantitativas, controladas por múltiplos *loci* genéticos referidos como *quantitative trait loci* (QTL's) (Franco-Duarte et al., 2014; Roncoroni, 2014). As ligações entre as variações alélicas e a diversidade fenotípica em leveduras podem ser estudadas utilizando abordagens baseadas em QTL (Brion et al., 2013; Cubillos et al., 2011; Hu et al., 2006; Marullo et al., 2007a; Salinas et al., 2012; Steinmetz et al., 2002). Estas abordagens baseiam-se no cruzamento de estirpes com fenótipos distintos (e.g. uma muito resistente e outra pouco tolerante a um determinado composto) e na análise genotípica dos híbridos resultantes para identificar as regiões do genoma que contribuem para a característica em análise (Borneman et al., 2012).

Nos últimos anos, utilizando o mapeamento de QTL's, têm sido caracterizadas muitas regiões genómicas que contêm ou estão ligadas aos genes responsáveis pelas variações quantitativas das características enológicas. Assim têm sido identificadas as bases genéticas que controlam algumas características tecnológicas que influenciam a vinificação, tais como a duração da fase de latência (Marullo et al., 2007b; Zimmer et al., 2014), a floculação (Brauer, 2006), a tolerância ao etanol (Hu et al., 2006), a taxa de fermentação (Ambroset et al., 2011), a utilização de azoto (Ambroset et al., 2011; Jara et al., 2014), a adaptação aos sulfitos adicionados no início da fermentação (Zimmer et al., 2014) e o teor de açúcares residuais (Salinas et al., 2012). Também têm sido revelados QTL's responsáveis pela produção de alguns metabolitos que contribuem para a qualidade organoléptica dos vinhos, como: o ácido acético (Marullo et al., 2007a; Salinas et al., 2012); os compostos fenólicos indesejáveis (POF - *phenolic off-flavours*) (Marullo et al., 2007b); o sulfureto de hidrogénio (Marullo et al., 2007b) e outros compostos de enxofre indesejáveis (Noble et al., 2015); o glicerol (Salinas et al., 2012); e o 2-fenil etanol, o nerolidol, os ésteres etílicos, entre outros (Steyer et al., 2012).

6 O MERCADO GLOBAL DAS LEVEDURAS

De todos os microrganismos industriais, as leveduras são o principal grupo utilizado no fabrico de produtos biotecnológicos em todo o mundo, superando a produção, em capacidade e receitas económicas, de qualquer outro grupo (Johnson and Echavarri-Erasun, 2011). De facto, um estudo do mercado das culturas *starter* (leveduras, bactérias e fungos) verificou que, em 2012, as leveduras foram o maior segmento dentro do setor, tanto em termos de valor como de volume (MarketsandMarkets, 2014a).

As leveduras, dada a sua diversidade e versatilidade, têm sido utilizadas em vários setores biotecnológicos, com particular incidência nas indústrias de alimentos e de bebidas, de rações, de fármacos, entre outras. O mercado global das leveduras está segmentado em categorias que incluem as da panificação, da cerveja, do vinho, das rações, do bioetanol, das nutricionais, entre outras. Os subprodutos das leveduras (extrato de levedura, autolisados de levedura, beta-glucanos, corantes, antioxidantes, vitaminas, minerais, etc.) são utilizados como ingredientes e aditivos alimentares, como nutrição animal, entre outros. O mercado destes produtos especiais é relativamente pequeno, mas a crescente procura de produtos alimentares de conveniência tem potenciado este comércio (MarketsandMarkets, 2014b).

O aumento das aplicações biotecnológicas das leveduras e dos seus subprodutos está a sustentar o crescimento deste mercado à escala global. É expectável que esta tendência se mantenha no período entre 2013 e 2018, com o valor do mercado das leveduras a crescer a uma CAGR (taxa composta de crescimento anual) de 8,8% e o dos produtos especiais de leveduras a uma CAGR de 6,9%, estando projetado valerem em 2018 cerca de 3,3 mil milhões de euros e 1,95 mil milhões de euros, respetivamente (MarketsandMarkets, 2014b). A Europa lidera o mercado das leveduras (MarketsandMarkets, 2014b; Reportlinker, 2014), com uma produção anual de cerca de 1 milhão de toneladas (COFALEC, n.d.), mas este cenário pode alterar-se no futuro uma vez que a Ásia-Pacífico está a entrar no mercado (MarketsandMarkets, 2014b). Em 2012, o mercado europeu foi extremamente competitivo devido ao aumento do consumo de produtos como a cerveja, o vinho e o pão (MarketsandMarkets, 2014b), tendo-se verificado nesse ano a taxa de utilização mais elevada das leveduras da panificação (Reportlinker, 2014). Estas últimas são as que têm maior quota de mercado, e em 2010 representaram mais de 31% do mercado global (Reportlinker, 2012).

6.1 O MERCADO GLOBAL DO VINHO E DAS LEVEDURAS ENOLÓGICAS

As leveduras enológicas desempenham uma função fundamental no processo produtivo do vinho - a fermentação – tendo por isso um grande impacto na composição e qualidade do produto final. A grande maioria dos produtores vitivinícolas, particularmente os que vinificam grandes volumes, utiliza culturas *starter* de leveduras, garantido desta forma que as fermentações são controladas e consistentes, e que os vinhos produzidos são qualidade e mantêm a uniformidade das características de ano para ano. Desta forma, o mercado das leveduras enológicas e o dos vinhos estão interligados e influenciam-se mutuamente.

O mercado vitícola é marcado há vários anos por um excesso de produção (Figura II-2), que foi em média 12%, entre 2000 e 2014.

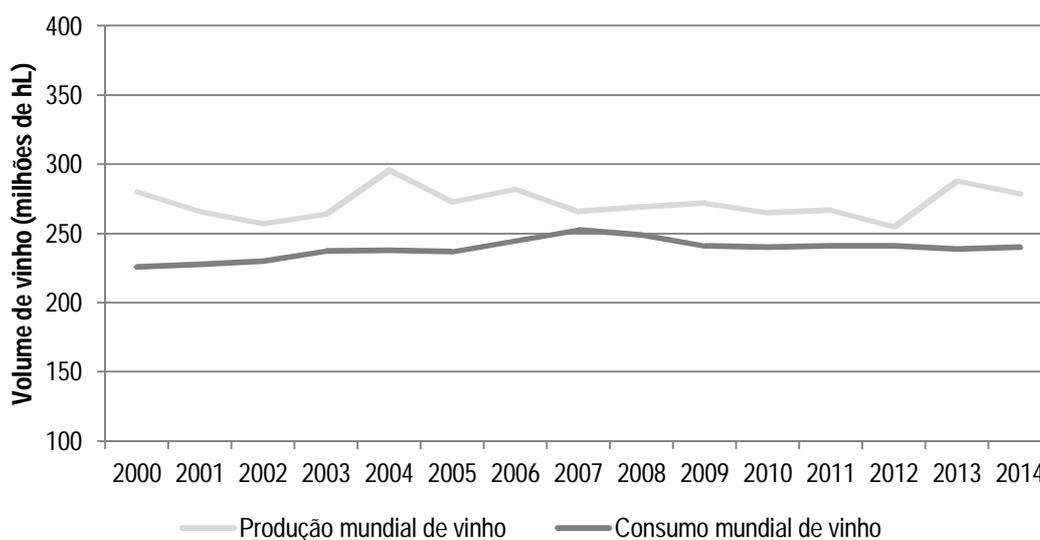


Figura II-2: Produção e consumo mundial de vinho nos últimos 14 anos (OIV, 2015, 2014a, 2014b).

A crise económica global de 2008 afetou o consumo mundial, que teve um decréscimo e parece ter estabilizado a partir dessa altura (OIV, 2014c). O consumo global de vinho em 2014 foi cerca de 240 milhões de hectolitros, tendo-se observado um decréscimo de 2,4 milhões relativamente a 2013 (OIV, 2015).

A produção de vinho é muito fragmentada, especialmente na Europa onde o número de marcas e produtores é muito elevado, e está concentrada em poucos países (Santini and Rabino, 2012). Cerca de 80% do vinho produzido em 2014 foi proveniente de apenas 10 países (OIV, 2014b), que se encontram descritos na Tabela II-2.

Tabela II-2: Volume de vinho produzido em 2014 nos dez principais países produtores (OIV, 2014b).

País	Posição	Vinho produzido em 2014 (MhL)
França	1	46,1
Itália	2	44,4
Espanha	3	37,0
Estados Unidos	4	22,5
Argentina	5	15,2
Austrália	6	12,6
China	7	11,8
África do Sul	8	11,4
Chile	9	10,0
Alemanha	10	9,7

Atualmente, os principais países produtores são a França, a Itália e a Espanha. A Europa ainda é o maior produtor de vinho, apesar do decréscimo que se tem observado nos últimos anos em consequência do programa da União Europeia (UE) que subsidiou o abandono permanente de vinhas (Council Regulation (EC), 2008) para regular a produção de vinho. Simultaneamente, a área de plantação de vinha fora da Europa continua a aumentar, em particular na Ásia, sendo atualmente a China o segundo país com maior área de vinha plantada (OIV, 2015), logo a seguir a Espanha. A produção de vinho também continua a aumentar nos Estados Unidos e no hemisfério sul (OIV, 2014a). Porém, este panorama poderá ser alterado dado que a Comissão Europeia apresentou recentemente uma regulamentação que flexibiliza o regime de direitos de plantação (Comissão Europeia, 2015), e que tem por objetivo aumentar a produção vinícola europeia.

Em 2014, a produção mundial de vinho foi cerca de 279 milhões de hectolitros, observando-se uma redução relativamente ao ano anterior (OIV, 2015). Embora não se tenha encontrado dados estatísticos sobre a quantidade de leveduras vínicas produzidas ou comercializadas, pode-se fazer uma estimativa com base no vinho produzido em 2014. Assim, considerando que em 90% do volume da produção mundial foram utilizadas leveduras comerciais e sabendo que na produção de 1 hL de vinho são utilizados, em média, cerca de 30 g de levedura *starter*, estima-se que foram usadas cerca de 7,5 mil toneladas de leveduras

enológicas em 2014. De referir que esta quantidade de leveduras não inclui, por exemplo, as que são utilizadas na produção de vinho espumante ou no recomeço de fermentações (quando acontecem “paragens” de fermentação). Relativamente aos preços praticados por embalagem de produto liofilizado, as leveduras enológicas são comercializadas com valores superiores aos das leveduras de panificação. Numa breve pesquisa realizada sobre os preços praticados *on-line*, para embalagens de 0,5 kg, observou-se que as leveduras enológicas têm valores dois a oito vezes superiores aos das da panificação, variando entre 11,30 € e 39,80 € e entre 5,70 € e 6,90 €, respetivamente³.

O Mercado das leveduras é altamente competitivo e é dominado por um número restrito de empresas produtoras que fornecem uma gama limitada de leveduras *starter* para aplicação enológica (Tabela II-3).

Tabela II-3: Principais empresas produtoras de leveduras *starter* para aplicação enológica.

Empresas	País	Leveduras <i>starter</i> para aplicação enológica
AB Mauri (Grupo Associated British Foods)	Reino Unido	18 <i>starters</i> , recomendados para um leque de cerca de 40 castas, e sete características do produto final.
Fermentis (Grupo Lesaffre)	França	10 <i>starters</i> , de aplicação genérica em vinhos brancos, tintos ou rosés e de acordo com as características sensoriais (cor, aroma, sabor) do produto final.
Angel Yeast Co. Ltd.	China	9 <i>starters</i> de aplicação genérica em vinhos brancos, tintos ou rosés e de acordo com as necessidades em azoto, tolerância ao álcool, temperatura de fermentação e carácter frutado dos vinhos.
Lallemand	Canadá	42 <i>starters</i> , para aplicação em vinhos brancos, tintos e rosés e de acordo com as necessidades em azoto, tolerância ao álcool, temperatura de fermentação e características do produto final.

As principais empresas que produzem leveduras *starter* para aplicação enológica, são as mesmas que produzem para o mercado global, ou seja, como referido anteriormente, também produzem leveduras para outras indústrias alimentares (panificação, cervejeira, sake, etc), assim como para a produção de bioetanol, de rações, entre outras.

Entre 2009 e 2013, as estratégias de crescimento adoptadas pelas empresas líderes do mercado global de leveduras foram: o lançamento de novos produtos; os acordos, as parcerias e as colaborações; as expansões e os investimentos; e as fusões e as aquisições

³ www.brouwland.com/en/our-products/winemaking/yeast (accessed 5.11.15); www.buywholefoodsonline.co.uk/nsearch/?p=1&q=yeast (accessed 5.11.15); www.napafermentation.com/yeast1.html (accessed 5.11.15).

(MarketsandMarkets, 2014b). Os principais intervenientes do mercado adotaram o lançamento de novos produtos (leveduras para rações, para bioetanol, vários extratos de levedura, etc.) como a estratégia preferida para se sustentarem no mercado (MarketsandMarkets, 2014b). A seguir, as estratégias mais adoptadas pelas empresas líder foram os acordos, as parcerias e as colaborações com outras empresas para, por exemplo, distribuir os seus produtos noutros mercados ou produzir leveduras para outras marcas. As empresas também expandiram as suas fábricas para diferentes países para fortalecer a sua rede global. Já as fusões e aquisições reforçam a liderança de mercado das principais empresas, que assim conseguem manter uma gama limitada de produtos com grande abrangência de mercado. Desta forma, as empresas líder trabalham para um mercado de escala e conseguem reduzidos custos unitários de produção e suprimem a necessidade de adaptação das unidades de produção com as especificidades de cada espécie ou estirpe.

6.2 TENDÊNCIAS DO MERCADO DO VINHO

O Mercado do vinho é um setor cada vez mais internacionalizado. Desde 2000, a quota de mercado que é transacionada internacionalmente quase que duplicou. Nesse ano, 25 % do vinho consumido no mundo era importado e em 2013 essa quota atingiu mais de 40% (OIV, 2014a). Em 2013 as transações de vinho decresceram 2,2% em volume mas, apesar disso, o aumento de preços permitiu um incremento de 1,5% de retorno (OIV, 2014a). Na Europa, os principais países têm estabilizado as suas transações em volume de vinho mas o seu valor tem aumentado (OIV, 2014a).

O consumo mundial de vinho tem aumentado na Ásia, América e Europa de Leste (CCE, 2009). O período de 2000 a 2013 foi caracterizado por uma transferência para novos polos de consumo de vinho. Os países não europeus aumentaram o consumo de 31% para 39%, enquanto os países europeus tradicionalmente consumidores diminuíram de 69% para 61% (OIV, 2014c). Em 2014 os Estados Unidos foram o maior país consumidor (OIV, 2015). Relativamente ao tipo de vinho consumido, o mercado de espumante tem-se expandido nos últimos anos impulsionado pela elevada procura global (OIV, 2014a). Entre 2003 e 2013 a produção aumentou cerca de 40% e o consumo cerca de 30%. Em 2013 foram produzidos 17,6 milhões de hectolitros, que corresponderam a 7% da produção mundial de vinho (OIV, 2014a).

Nesta última década tem-se observado que o consumidor é cada vez mais exigente, procura novos estilos de vinhos, que sejam produzidos de forma sustentável e até mesmo

fatores extrínsecos como o *design* da garrafa e do rótulo, são importantes (Bisson et al, 2002; Fleet, 2008). Prevê-se que esta tendência continue nos próximos anos já que, de acordo com o CCE (Comité national conseillers du commerce extérieur de la France), em 2050 o consumidor de vinho será ocasional e pouco fidelizado, de diferentes origens geográficas e culturais e procurará vinhos diversificados e sofisticados (CCE, 2009).

Neste panorama, as empresas vitivinícolas dos países produtores tradicionais (França, Espanha, Itália, Portugal ou Alemanha) precisam de garantir o seu posicionamento no mercado, uma vez que enfrentam uma situação complexa resultante da diminuição do consumo interno de vinho, da concorrência dos novos países produtores (Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Estados Unidos da América, China, Chile, e Argentina) no mercado externo, da assimetria regulamentar internacional (mais exigente na União Europeia) e da evolução de gostos e tendências do consumidor. Desenvolver soluções criativas que satisfaçam as diferentes preferências dos consumidores à escala global poderá marcar a diferença no mercado internacional. A utilização de novos *starters* de leveduras, devido ao enorme impacto que têm, quer no desempenho tecnológico da fermentação quer nas características do produto final, é uma abordagem simples e rápida para obter vinhos que correspondam às expectativas dos consumidores, sem investimentos a longo prazo por parte dos produtores.

7 NOVOS STARTERS DE LEVEDURAS PARA APLICAÇÃO ENOLÓGICA

A obtenção de novos *starters* de leveduras para aplicação comercial pode ser conseguida essencialmente com base em duas estratégias: a exploração da diversidade natural das estirpes de leveduras e o melhoramento genético de isolados naturais (Fleet, 2008; Steensels et al., 2014).

A enorme diversidade natural de leveduras, em particular as da espécie *S. cerevisiae*, preferencialmente usada nas fermentações vínicas, é um recurso biológico que pode fornecer muitas estirpes com potencial para aplicação industrial. A exploração de isolados de leveduras obtidos em nichos similares aos meios fermentativos específicos, pode fornecer estirpes superiores para culturas *starter*, na medida em que a adaptação e evolução contínua das estirpes indígenas ao seu ambiente pode tê-las munido com fenótipos importantes para a indústria (Steensels et al., 2014). Assim, a obtenção de estirpes com características enológicas particulares pode ser conseguida recorrendo à análise genotípica e fenotípica em larga escala de

isolados naturais de leveduras recolhidos em *habitats* vitivinícolas (vinhas, uvas, fermentações espontâneas e adegas). De facto, têm sido realizados vários estudos de biodiversidade de leveduras vnicas em determinadas regiões vinícolas que resultaram na seleção de estirpes autóctones para utilização como culturas *starter* na produção de vinho (Blanco et al., 2013; Capece et al., 2010b; Lopes et al., 2007a; Mannazzu, I., Clementi, F. and Ciani, 2002; Ortiz et al., 2013; Rodríguez-Palero et al., 2013; Sorrentino et al., 2012; Tristezza et al., 2012; Zagorc et al., 2001). Aliás, tem sido defendido que a inoculação de fermentações com estirpes autóctones de *S. cerevisiae*, por se terem adaptado às condições ambientais locais (clima, solo, castas de uvas, ou práticas agrícolas), pode imprimir ao vinho características que se identificam com a tipicidade de um determinado local (Cappello et al., 2004; Csoma et al., 2010; Esteve-Zaroso et al., 2000; Nikolaou et al., 2006; Romano et al., 2008). Efetivamente, estudos recentes têm demonstrado que existem diferenças não aleatórias entre populações microbianas de diversas regiões, sustentando o conceito de que existe uma componente microbiológica do *terroir* (Bokulich et al., 2014; Gayevskiy and Goddard, 2012; Knight and Goddard, 2014). Estes resultados podem ter grande importância para a indústria vitivinícola, na medida em que valorizam este recurso biológico e a sua utilização como *starter* na produção de vinhos característicos de determinadas regiões.

Apesar da imensa diversidade natural das leveduras, as condições específicas das fermentações ou as características pretendidas para o produto, requerem por vezes uma combinação de características fenotípicas que é improvável encontrar na natureza (Giudici et al., 2005; Schuller and Casal, 2005; Steensels et al., 2014). Existem várias técnicas que aumentam artificialmente a diversidade de leveduras existente e geram estirpes que podem ter melhores desempenhos nas condições industriais que as que são seleccionadas em ambientes naturais (Steensels et al., 2014). Técnicas como a mutagénesis, a hibridização e a evolução adaptativa, originam produtos que se excluem da definição de microrganismos geneticamente modificados (MGMs) e, por essa razão, as estirpes melhoradas geneticamente por estas abordagens não têm nem as restrições legais nem a perceção negativa dos consumidores sobre os MGMs (Pérez-Torrado et al., 2015; Steensels et al., 2014). A directiva europeia 2009/41/CE, relativa à utilização confinada de microrganismos geneticamente modificados, define MGM como “um microrganismo cujo material genético tenha sido modificado por uma forma de reprodução sexuada e/ou de recombinação natural que não ocorre na natureza” (CE, 2009). Assim, ao contrário do que acontece noutras regiões, técnicas como a fusão de protoplastos, o *genome shuffling* e a cito-indução originam microrganismos que são incluídos na definição de MGM.

Embora estas técnicas não modifiquem o genoma do microrganismo usando DNA recombinante, recorrem à fusão de duas ou mais células por métodos que não ocorrem na natureza. Na fusão de protoplastos, as células são unidas assexuadamente, após remoção da parede celular num meio de suporte osmótico; o *genome shuffling* permite o cruzamento multiparental, através da chamada “fusão de protoplastos recursiva” (Zhang et al., 2002); e a cito-indução permite transferir características herdadas citoplasmaticamente bloqueando a fusão nuclear (Chambers et al., 2009a; Steensels et al., 2014).

Para fazer a escolha da técnica de melhoramento mais apropriada, é essencial conhecer a natureza genética da característica que se pretende melhorar (monogénica ou poligénica). Normalmente, as características enológicas mais importantes, como o vigor fermentativo, rendimento e tolerância ao etanol, e perfil de temperaturas de crescimento, dependem de uma multiplicidade de *loci* (QTLs) que não estão bem caracterizados porque estão distribuídos por todo o genoma, e muitas vezes, cada *locus* é responsável apenas por uma pequena parte da variação fenotípica (Giudici et al., 2005).

7.1 MUTAGÉNESE

A mutação origina variações genéticas que são fundamentais para o processo evolutivo (Chambers et al., 2009a). A média da frequência de mutações espontâneas em *S. cerevisiae*, num qualquer *locus* particular, é de aproximadamente 10^{-6} por geração (Pretorius and van der Westhuizen, 1991), mas as técnicas de mutagénesse aumentam significativamente essa frequência (Pretorius, 2000). A indução de mutações aleatórias *in vivo* é realizada através de agentes mutagénicos físicos, como a irradiação ultravioleta (UV) e a ionizante, ou químicos, como o etilmetanosulfonato (EMS), o dietilsulfonato (DES), a nitrosoguanidina (NTG) e a metilnitronitrosoguanidina (MNNG), cujas doses devem ser cuidadosamente selecionadas tendo em consideração a estirpe e as condições utilizadas (Chambers et al., 2009a; Steensels et al., 2014). Subsequentemente é efetuada a seleção das células com fenótipos melhorados.

Esta abordagem de mutação seguida de seleção parece ser a mais lógica para o desenvolvimento de novas estirpes quando se pretende manter constante o desempenho de um grande número de parâmetros e alterar apenas um (Pretorius, 2000), sendo muitas vezes usada para eliminar características monogénicas indesejáveis nas estirpes vnicas (Giudici et al., 2005). Contudo, a mutação das leveduras vnicas pode melhorar certas características mas simultaneamente enfraquecer outras (Hammond, 1996). Para além disso nesta técnica, embora não seja essencial, é preferível utilizar estirpes haplóides de leveduras vnicas, uma vez que nas estirpes diplóides ou poliplóides apenas as mutações dominantes podem alterar diretamente os

fenótipos (Pretorius, 2000). No entanto, as estirpes haplóides de *S. cerevisiae* indígenas de vinhas ou de adegas tendem a ser homotáticas (Mortimer et al., 1994), ou seja, têm a capacidade de trocar o seu *mating type* de a para α e vice-versa, e nesse caso não se conseguem manter culturas celulares estáveis (Steensels et al., 2014). Para contornar esta questão, a mutagénesse pode ser aplicada aos esporos das estirpes homotáticas, alternativamente às células haplóides vegetativas (Romano et al., 1983; Rous and Snow, 1983; Steensels et al., 2014).

A mutagénesse tem sido utilizada para gerar estirpes vnicas com fenótipos melhorados. São exemplos estirpes que produzem quantidades reduzidas de H_2S (Cordente et al., 2009; Rupela and Tauro, 1984), mais tolerantes ao etanol (Snow, 1983), com melhores propriedades de sedimentação (Snow, 1983), com autólise mais eficiente (Gonzalez et al., 2003), ou que produzem menos ácido acético durante a fermentação (Cordente et al., 2013).

7.2 HIBRIDIZAÇÃO

A hibridização é uma técnica poderosa para gerar diversidade artificial em leveduras. Devido à, por vezes complexa, genética das leveduras (ploidia, esporulação), têm sido desenvolvidas diferentes técnicas, que na sua maioria partem de duas linhagens selecionadas para o fenótipo pretendido (Steensels et al., 2014).

A hibridização sexual, também conhecida como cruzamento ou *mating*, é a forma mais intuitiva de gerar diversidade artificial por ser muito similar à seleção artificial que se faz na agricultura (Steensels et al., 2014). Resumidamente, o ciclo sexual ocorre da seguinte forma: as células diplóides esporulam (ocorrendo meiose) para produzir um asco contendo quatro gâmetas conhecidos como ascósporos. Cada esporo terá um *mating type* "a" ou " α ", capaz de se cruzar com outro esporo do *mating type* oposto para gerar células diplóides a/α . Estas células podem esporular novamente para criar outra geração de esporos haplóides (Chambers et al., 2009a). Um híbrido é o resultado do cruzamento entre dois indivíduos da mesma espécie (híbridos intra-específicos) ou entre indivíduos de espécies diferentes (híbridos interespecíficos). Todas as espécies de *Saccharomyces* do complexo *sensu stricto* têm o mesmo sistema de cruzamento, *mating type* a/α , e assim sendo têm o potencial para cruzamentos interespecíficos (Chambers et al., 2009a).

No cruzamento direto (*direct mating*), são cruzadas duas células, ou dois esporos, haplóides de *mating type* oposto. Quando as duas linhagens haplóides são heterotáticas, isto é, não têm a capacidade de trocar o seu *mating type*, podem ser previamente rastreadas e

selecionadas, e pode ser aplicado um cruzamento célula a célula. Se uma das linhagens haplóides (ou ambas) for homotática, o cruzamento deve ser feito esporo a célula ou esporo a esporo (Steensels et al., 2014). No entanto, estes dois últimos tipos de cruzamento têm a desvantagem de não possibilitar a caracterização previa dos esporos utilizados, e portanto estes podem não possuir o fenótipo desejado da estirpe parental (Attfield and Bell, 2003). Esta técnica, embora demorada, tem provado ser uma abordagem eficiente para obter híbridos (Sipiczki, 2008), sendo os cruzamentos esporo a esporo e célula a esporo aplicados regularmente para criar novos híbridos, principalmente interespecíficos. Para a indústria vínica foram obtidos novos híbridos para conseguir, por exemplo, leveduras vínicas criotolerantes capazes de produzir toxinas *killer* (Hara et al., 1981) ou para incluir a capacidade de floculação numa estirpe de levedura para a produção de vinhos espumantes (Coloretti et al., 2006).

Ocasionalmente, as leveduras diplóides passam por uma mudança de *mating type* homotática, resultando numa célula diplóide *a/a* ou *α/α*. Estas células podem subsequentemente cruzar com uma célula haplóide de *mating type* oposto, num processo designado de *rare mating*, em que as estirpes são cruzadas sem o passo da esporulação. Os híbridos formados são triplóides, mas podem ser obtidos híbridos tetraplóides se a segunda célula for diplóide. A abordagem *rare mating* possibilita a formação de híbridos quando o *direct mating* (ou *mass mating*, ver parágrafo seguinte) não é exequível, uma vez que muitas leveduras industriais e selvagens são recalcitrantes no que diz respeito à formação ou viabilidade dos esporos (Chambers et al., 2009a; Johnston et al., 2000; Steensels et al., 2014). Esta abordagem foi utilizada para construir estirpes vínicas criotolerantes (Pérez-Través et al., 2012) e híbridos interespecíficos que diversificam o perfil aromático dos vinhos (Bellon et al., 2013, 2011).

A técnica de *mass mating* utiliza um grande número de células haplóides de leveduras, de diferentes estirpes progenitoras ou de uma população heterogénea da mesma estirpe, que são misturadas e cruzadas aleatoriamente. Esta técnica é particularmente útil para melhorar estirpes homotáticas, que mostram uma baixa eficiência de cruzamentos, ou para a criação de híbridos interespecíficos (Kunicka-Styczyńska and Rajkowska, 2011). A abordagem de *mass mating* foi utilizada para produzir novas estirpes vínicas, combinando híbridos interespecíficos de *Saccharomyces* produtores de ésteres com mutantes de *S. cerevisiae* com boas características enológicas (Bizaj et al., 2012).

7.3 EVOLUÇÃO ADAPTATIVA

Os microrganismos têm capacidade de se adaptarem rapidamente a diferentes condições ambientais. Nos últimos anos esta propriedade tem sido explorada em experiências

de evolução laboratorial adaptativa para estudar os princípios e as características da evolução (Barrick and Lenski, 2013; Cakar et al., 2012; Dhar et al., 2011; Gerstein et al., 2011; Kvittek and Sherlock, 2011; Selmecki et al., 2015).

O melhoramento de estirpes por evolução adaptativa, também designada de evolução direcionada ou de engenharia evolutiva, fundamenta-se nos princípios básicos da variação genética (natural e/ou induzida), atuando na seleção dessa variação (Steensels et al., 2014). Em geral, a população celular é mantida em condições controladas num ambiente seletivo para um determinado fenótipo e ao longo de várias gerações vão ocorrendo mutantes aleatórios nesta população (Chambers et al., 2009a; Mouret et al., 2014). Estes, mesmo apenas com uma vantagem seletiva marginal, superam a restante população e implementam-se na cultura (Dykhuizen and Hartl, 1983). Os mutantes que apresentem melhores desempenhos relativamente ao fenótipo pretendido são selecionados ou podem ainda ser novamente incluídos num cultivo sob pressão seletiva. Assim, as estratégias da evolução adaptativa consistem em extensas fases de seleção -que podem incluir técnicas de culturas em contínuo, de transferências em série de culturas *batch*, ou até mesmo de seleção em placa- ao longo de muitas gerações para conduzir mudanças evolutivas (Chambers et al., 2009a). A evolução adaptativa também pode ser combinada com o uso de agentes mutagénicos e/ou hibridização na(s) população(ões) em evolução de modo a aumentar a variabilidade genética e fenotípica onde a seleção possa atuar (Chambers et al., 2009a; Steensels et al., 2014).

Devido aos tempos curtos das gerações e à fácil manipulação e cultivo dos microrganismos no laboratório, a evolução adaptativa é uma abordagem viável para gerar estirpes de leveduras com fenótipos melhorados de um modo relativamente rápido (Buckling et al., 2009; Elena and Lenski, 2003). Normalmente, a evolução adaptativa é usada para afinar um fenótipo específico que, embora já esteja presente na estirpe, ainda não é ótimo. Esta abordagem é particularmente indicada quando se pretende melhorar fenótipos que são modelados por múltiplos genes, uma vez que a seleção a longo prazo, contínua ou interativa, proporciona a acumulação de mutações que conferem um aumento da vantagem seletiva, impelindo a alteração do fenótipo na direção desejada (Chambers et al., 2009a).

A evolução adaptativa tem sido utilizada para melhorar estirpes de leveduras para a vinificação (Cadière et al., 2011; Cakar et al., 2012; Kutyna et al., 2012; McBryde et al., 2006; Mezzetti et al., 2014; Novo et al., 2014; Stanley et al., 2010; Tilloy et al., 2014). Destacam-se algumas características das leveduras que foram melhoradas por esta abordagem: o aumento da produção de glutatona, um composto que tem um papel importante na prevenção da oxidação

do mosto e do vinho (Mezzetti et al., 2014); a redução do rendimento de etanol e o aumento da produção de glicerol (Tilloy et al., 2014); a diminuição da produção de acetato, taxas de fermentação mais elevadas e o aumento da taxa de produção de compostos voláteis do aroma (Cadière et al., 2011; Mouret et al., 2014); o aumento da produção de glicerol (Kutyna et al., 2012) e a melhoria da cinética da fermentação (Novo et al., 2014).

CAPÍTULO III

EXTRAÇÃO DE DNA DE LEVEDURAS EM MICROPLACAS: UM MÉTODO SIMPLES, ECONÓMICO E DE ALTO DÉBITO

J. Drumonde-Neves^{1,2(a)}, E. Vieira^{1,3(a)}, M. T. Lima², I. Araujo³, M. Casal¹, D. Schuller¹

¹ Centro de Biologia Molecular e Ambiental (CBMA) / Departamento de Biologia / Universidade do Minho, Braga, Portugal

² Centro de Investigação de Tecnologias Agrárias, Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, Portugal

³ Vinalia – Soluções de Biotecnologia para a Vitivinicultura, Lda, Braga, Portugal

^(a) Estes autores contribuíram de forma equivalente para este trabalho.

Versão inglesa publicada no **Journal of Microbiological Methods** – 2013; 93 (3): 206–208

RESUMO

Os estudos sobre a biodiversidade de leveduras, relacionados com investigações nas áreas da ecologia e da evolução, ou no âmbito de aplicações industriais, envolvem a análise de um grande número de amostras biológicas. Estas devem ser preferencialmente processadas por metodologias de análise de alto rendimento, económicas e eficientes, tanto para o isolamento de DNA genómico como para a caracterização genética ou fenotípica. Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método de extração de DNA num formato de microplacas de 96 poços, para *Saccharomyces cerevisiae* e outras espécies de leveduras, que envolve a ruptura enzimática da parede celular seguida de lise das células com um detergente, e da precipitação de DNA com isopropanol e etanol. A concentração média de DNA obtida a partir de 12 estirpes *S. cerevisiae* e de outras 12 espécies de culturas crescidas em microplaca foi de 20 ng/ μ L e 50 ng/ μ L, respetivamente. Este método revelou-se adequado para utilização direta na amplificação por PCR para análise de sequências interdelta, *loci* de microssatélites ou regiões ITS ribossomais. O protocolo de extração de DNA descrito neste trabalho permite processar manualmente 16 microplacas (1536 isolados) num dia de trabalho. Adicionalmente, o custo dos consumíveis e reagentes é significativamente inferior quando comparado às opções disponíveis comercialmente para a extração de DNA.

1 INTRODUÇÃO

A investigação nas áreas da biodiversidade de leveduras e da biologia de sistemas complementam-se e são atualmente considerados fatores decisivos na inovação biotecnológica, permitindo a introdução de diversidade genética controlada em estirpes para uso comercial, tendo como base a compreensão completa da complexidade de genomas (Roberts and Oliver, 2011). Até 2011, foram descritas aproximadamente 1500 espécies de leveduras, pertencentes a mais de 100 géneros (Kurtzman et al., 2011). Desde a conclusão da sequenciação do genoma da espécie *Saccharomyces cerevisiae* em 1996 (Goffeau et al., 1996), foram sequenciados os genomas de mais 42 espécies de leveduras (Souciet, 2011). Entretanto, a sequenciação em larga escala de 70 isolados de *S. cerevisiae* revelou uma variação considerável entre estirpes usadas para diferentes aplicações tecnológicas (Liti and Schacherer, 2011). A preservação da biodiversidade é essencial para aprofundar o conhecimento sobre os fatores ecológicos e evolutivos que modelam a constituição genómica das leveduras. As abordagens para estudar a diversidade intra- e interespecífica requerem não só ferramentas de alto débito para análise fenotípica, mas também métodos eficientes para o rápido isolamento de DNA para posterior análise genotípica.

Os métodos convencionais de extração de DNA de células de levedura envolvem a disrupção da parede celular, seja por fracionamento físico com esferas de vidro ou por digestão enzimática, por exemplo com zymolyase 20 T (Defontaine et al., 1991; Querol and Barrio, 1990). Outros métodos envolvem a manipulação de químicos perigosos, como o mercaptoetanol, brometo de cetiltrimetilamonio (CTAB), fenol ou clorofórmio, e podem ser muito demorados e trabalhosos. A extração do DNA também pode ser realizada sem a prévia quebra física ou digestão enzimática da parede celular, utilizando técnicas como: *colony*-PCR (Ward, 1992); ciclos de congelamento e descongelamento de células de levedura num tampão com Triton X-100 e dodecil sulfato de sódio (SDS), seguido de extração com clorofórmio e precipitação com etanol (Harju et al., 2004); ou a lise celular numa solução de acetato de lítio (LiOAc) com SDS (método LiOAc-SDS) e a subsequente precipitação com etanol (Lööke et al., 2011).

As soluções comerciais de isolamento rápido de DNA de levedura em larga escala, estão associadas a equipamentos que usam microplacas de 96 poços, ou a formatos similares que permitem manusear numerosas amostras. Por exemplo, o LabTurbo 496 System (TAIGEN) processa 96 a 384 amostras em 2 h e o MagNA Pure 96 (Roche) extrai o DNA de 96 amostras em menos de 1 h, de acordo com as indicações do fabricante. Para além destas soluções,

existem atualmente no mercado diversos *kits* comerciais que não requerem equipamento específico, mas podem ser morosos, à exceção dos que incluem microplacas e permitem processar 96 amostras em 30 a 60 min. Contudo, o uso rotineiro de *kits* comerciais para centenas ou milhares de amostras acarreta custos significativos.

O desempenho dos *kits* comerciais de isolamento de DNA tem sido avaliado na identificação de fungos patogénicos da área clínica. Tem-se verificado que a quantidade de DNA isolado é variável e depende do método e do *kit* (Fredricks et al., 2005; Loeffler et al., 1997), e que os métodos de extração automatizados têm uma sensibilidade similar ou mesmo superior quando comparados com os métodos manuais (Francesconi et al., 2008; Loeffler et al., 2002). Tanto quanto sabemos, e contrariamente a outros organismos como em plantas (Bashalkhanov and Rajora, 2008; Dilworth and Frey, 2000; Maxim and Carter, 2000), ainda não está disponível uma abordagem validada que utilize microplacas de 96 poços para extração de DNA de leveduras, que não dependa de *kits* ou equipamento específico.

A adaptação de um método de isolamento de DNA anteriormente descrito (Lopez et al., 2001) mostrou-se útil para diferentes métodos de tipagem molecular (Schuller et al., 2004), permitindo processar um máximo de 200 isolados por dia. No entanto, para o tratamento de um maior número de isolados este método é muito demorado. No presente trabalho descreve-se a otimização e validação de um método barato de isolamento de DNA, num formato de microplaca de 96 poços baseado num método previamente descrito (Lopez et al., 2001). Esta adaptação permite extrair o DNA de 1536 amostras (16 microplacas) de leveduras num dia de trabalho, numa gama de concentrações (20 a 100 ng/mL), que permite a utilização direta nas amplificações por PCR sem ajustes adicionais de concentração.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ESPÉCIES E ESTIRPES DE LEVEDURAS

Neste estudo foram usadas 12 espécies de leveduras (*Candida stellata*, *Candida tropicalis*, *Kregervanrija fluxuum*, *Dekkera bruxelensis*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Saccharomyces ludwigii*, *Lachancea thermotolerans*, *Torulasporea delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii* e *Yarrowia lipolytica*) e 12 estirpes de *S. cerevisiae* (L507, L508, L509, L510, L517, L528, L589, L590, L591, L592, L593, L594, designações atribuídas neste trabalho). Cada isolado foi congelado em glicerol (30 % v/v, -80 °C), em quadruplicado, em microplacas de 96 poços, tendo-se efetuado previamente um acerto

da concentração celular a aproximadamente 10^8 células/mL. Foram também efetuados congelamentos em quadruplicado sem o ajuste prévio da concentração celular.

2.2 OTIMIZAÇÃO DO VOLUME DE CULTURA E DO TEMPO DE CENTRIFUGAÇÃO PARA O ISOLAMENTO DE DNA EM MICROPLACAS

Na abordagem de otimização do método, foi avaliada a melhor combinação entre os volumes de cultura utilizados nos crescimentos que decorreram durante 12 h em microplacas (meio YPD: extrato de levedura 1% p/v, peptona 2% p/v e glucose 2% p/v; 30, 50, 100 e 150 μ L; estirpe *S. cerevisiae* L507), e os tempos de centrifugação para a precipitação de proteínas (5, 10, 15, 30, 45, e 60 min a 2250 g/4000 rpm, 4 °C). Estes testes foram realizados em quadruplicado. O isolamento de DNA foi efetuado de acordo com o protocolo descrito em seguida (2.3), e os volumes de reagentes ajustaram-se proporcionalmente às quantidades de meio YPD utilizados nos crescimentos testados.

2.3 VALIDAÇÃO DO PROTOCOLO DE ISOLAMENTO DE DNA EM MICROPLACAS

Para a validação do método aqui reportado, baseado na utilização de microplacas, foi efetuada a comparação com o protocolo convencional que recorre a microtubos (Schuller et al., 2005), usando os isolados de levedura mencionados anteriormente. A partir das amostras congeladas com concentração celular ajustada (10^8 células/mL, aproximadamente), inocularam-se em quadruplicado 1 e 5 μ L em 100 μ L e 1 mL de meio YPD, em microplacas e microtubos, respetivamente. O isolamento de DNA genómico foi realizado com base num método descrito (Lopez et al., 2001), que recorre à liticase para a digestão da parede celular. Foram introduzidas várias modificações para redução do tempo e otimização da extração de DNA, nomeadamente: (i) eliminação do passo inicial de lavagem das culturas celulares crescidas durante 12 h, (ii) mistura prévia do tampão de digestão com liticase, e do tampão de lise com SDS, (iii) aumento do tempo de incubação com liticase de 20 para 30 min, de modo a que a digestão da parede celular seja mais eficiente, (iv) adição do tampão de lise sem remoção do tampão de digestão anterior, (v) redução do tempo de centrifugação após precipitação do DNA com isopropanol de 10 min para 2 min.

Os volumes de reagentes indicados de seguida reportam-se para um poço da microplaca contendo 100 μ L de cultura celular. A extração de DNA foi realizada da seguinte forma: as culturas resultantes do crescimento durante 12 h foram centrifugadas (Microplacas: 2 min, 2250 g/ 4000 rpm; microtubos: 1 min, 16200 g/13000 rpm) e o sedimento ressuspenso em

10 µL de tampão de digestão (sorbitol 1 M, EDTA-Na₂ 0,1 M, pH 7,5) contendo 0,8 µL de uma solução de liticase a 3,3 U/µL (Sigma, Ref. L4025), adicionada ao tampão imediatamente antes da sua distribuição. Após incubação (30 min., 37 °C), a eficiência da digestão foi confirmada pela observação ao microscópio dos esferoblastos formados após misturar pequenas alíquotas (5 µL) de algumas amostras escolhidas aleatoriamente, com igual volume de SDS 10 % (p/v). Este passo não é necessário no isolamento de rotina. Seguidamente adicionou-se 10 µL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, EDTA-Na₂ 20 mM, SDS 0,35 M, pH 7,4), as microplacas foram seladas em sacos de plástico e procedeu-se à sua incubação num banho a 65 °C durante 5 minutos. Adicionou-se imediatamente uma solução de acetato de potássio (5 M, 8 µL) e a microplaca foi colocada a -20 °C durante 5 a 10 minutos para a precipitação das proteínas. Após centrifugação (microplacas: 4 °C, 15 min, 2250 g/4000 rpm; microtubos: 4 °C, 15 min, 16200 g/13000 rpm), o sobrenadante foi transferido para uma nova microplaca contendo 25 µL de isopropanol, para a precipitação do DNA à temperatura ambiente durante 5 minutos, seguindo-se outra centrifugação (microplacas: 4 °C, 2 min, 2250 g/4000 rpm; microtubos: 4 °C, 15 min, 16200 g/13 000 rpm). O DNA precipitado foi lavado com 50 µL de etanol 70 % (v/v) e posteriormente submetido a secagem ao ar (30 min, as tampas das microplacas foram retiradas, microtubos foram abertos). O sedimento foi então dissolvido em 50 µL de TE (Tris-HCl 1 mM, EDTA-Na₂ 0,1 mM, pH 7,5), diluído de 1:10.

2.4 REPRODUTIBILIDADE DO PROTOCOLO DE ISOLAMENTO DE DNA EM MICROPLACAS

Para testar a reprodutibilidade do método, o procedimento descrito foi realizado em quadruplicado usando as amostras armazenadas sem ajuste da concentração celular, de modo a avaliar a relevância deste passo para a obtenção da concentração de DNA que garanta amplificação reprodutível.

2.5 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A concentração de DNA foi quantificada por espectrofotometria (NanoDrop™ ND-1000, Thermo Fisher Scientific).

2.6 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS

O DNA isolado pelo método de extração em microplaca foi usado para ampliações por PCR e procedeu-se à identificação e caracterização de leveduras pelos seguintes métodos: (i) análise de polimorfismos do tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) de regiões ITS ribossomais (Esteve-Zarzoso et al., 1999) usando a endonuclease de restrição *Hinf*I; (ii) análise

de sequências interdelta (Schuller et al., 2004); (iii) análise de microssatélites, usando os *loci* listados na Tabela III-1 (ScAAT1, ScAAT2, ScAAT4, ScAAT5 e ScAAT6 (Pérez et al., 2001); YPL009c, ScYOR267c, C5 e C11 (Legras et al., 2005).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi desenvolver um procedimento de extração de DNA de levedura de elevado rendimento, simples, reproduzível e económico, que permita obter DNA numa concentração e pureza adequadas para reações de PCR usadas na tipagem molecular de leveduras. Este protocolo, baseado numa técnica descrita anteriormente (Lopez et al., 2001), foi simplificado e adaptado ao formato de microplacas de 96 poços.

Numa primeira abordagem de otimização da extração de DNA em microplacas, foi avaliada a combinação ideal entre o volume de meio YPD usado no crescimento das culturas celulares e o tempo de centrifugação para a remoção das proteínas precipitadas. Estes testes foram realizados em quadruplicado com a estirpe *S. cerevisiae* L507. Como se pode observar na Figura III-1, a concentração de DNA obtida variou entre 11 e 96 ng/ μ L. Os valores de concentração mais elevados tendem a ser obtidos com os tempos de centrifugação mais curtos (5 e 10 min). Para centrifugações mais longas (entre 15 e 60 min), a concentração de DNA variou entre 11 e 58 ng/ μ L, correspondendo aos valores geralmente requeridos nos métodos de tipagem molecular de leveduras baseados na amplificação por PCR. Em 83 % das condições testadas o rácio A_{260}/A_{280} foi superior a 1,8, que representa uma pureza de DNA satisfatória. A média mais elevada do rácio A_{260}/A_{230} foi obtida para o tempo de centrifugação de 15 min. Estes rácios variaram nos intervalos de 0,7 a 1,3, 0,8 a 1,5, 0,8 a 1,6, 0,7 a 1,4 e 0,7 a 1,3 para os tempos de centrifugação de 5, 10, 15, 30, 45 e 60 min, respetivamente (dados não apresentados).

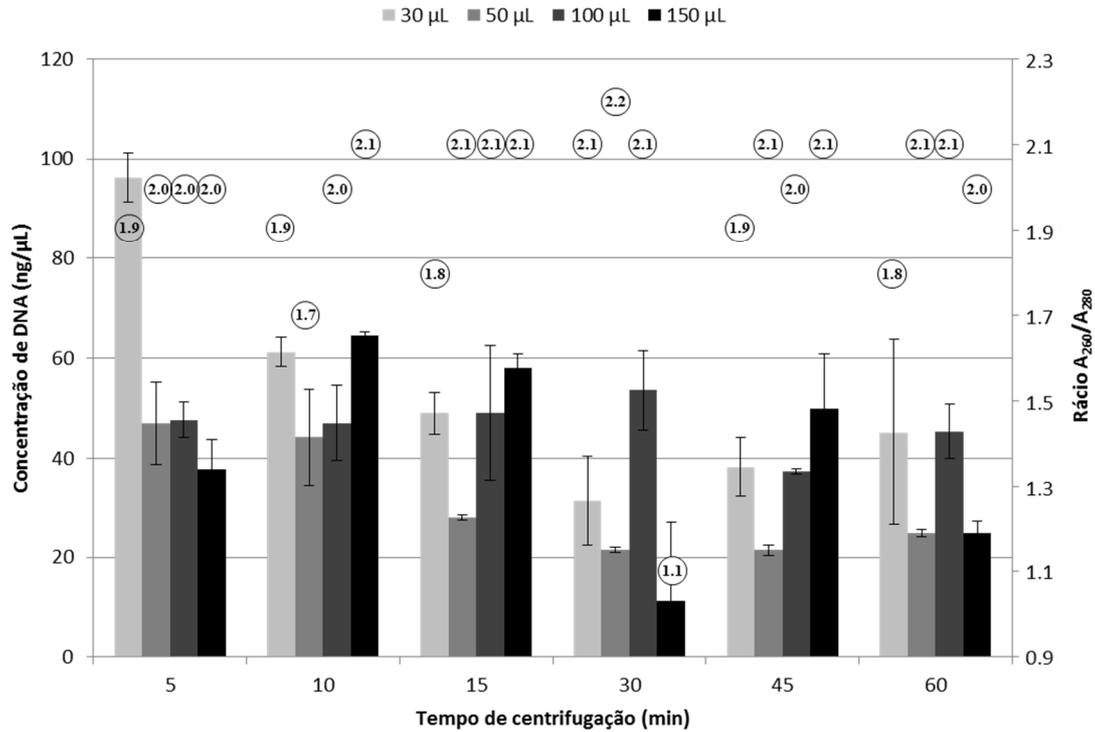


Figura III-1: Concentração de DNA (barras) obtida a partir de culturas da estirpe *S. cerevisiae* L507, crescidas durante 12 h em diferentes volumes de meio YPD (30, 50, 100 e 150 μL), e usando diferentes tempos de centrifugação (5, 10, 15, 30 e 60 min). Os rácios A_{260}/A_{280} apresentam-se indicados nos números dentro dos círculos.

Nas abordagens seguintes, foi utilizado o volume inicial de YPD de 100 μL, em conjunto com o tempo de centrifugação de 15 min. Esta quantidade de meio YPD permite uma melhor homogeneização das suspensões celulares durante o crescimento e facilita a pipetagem de todos os volumes dos reagentes necessários durante o processo de extração. Tal revelou-se de particular importância na transferência dos sobrenadantes para o isopropanol. Quando se inicia a extração de DNA a partir de volumes de cultura inferiores a 100 μL, o correspondente volume de sobrenadante a ser transferido para isopropanol é inferior a 30 μL, o que aumenta o risco de contaminações com o sedimento devido a uma pipetagem imprecisa. Com o volume de 100 μL observaram-se valores de concentração final de DNA mais reprodutíveis, independentemente do tempo de centrifugação.

O método de extração de DNA em microplaca foi validado com 12 estirpes de *S. cerevisiae* e outras 12 espécies de leveduras, comparando a concentração e o rácio A_{260}/A_{280} do DNA com o obtido pela extração em microtubos, de acordo com a nossa abordagem anterior (Schuller et al., 2005). Os resultados médios de quatro réplicas estão representados na Figura II-2. As concentrações de DNA obtidas para as estirpes de *S. cerevisiae* variou entre 670 e 1110

ng/ μ L e entre 20 e 40 ng/ μ L nas extrações em microtubos e microplacas, respetivamente. No caso das espécies de não-*Saccharomyces*, a concentração correspondente foi mais variável, apresentando valores entre 100 e 1010 ng/ μ L e entre 10 e 140 ng/ μ L para o método com microtubos e para o método com microplaca, respetivamente. A média das concentrações de DNA obtidas a partir de 12 espécies de leveduras e de 12 estirpes de *S. cerevisiae* crescidas em microplaca foi respetivamente 50 ng/ μ L e 20 ng/ μ L. Estes valores são adequados para as amplificações por PCR, revelando-se desnecessário efetuar diluições. No caso do protocolo realizado em microtubos verificou-se que o valor médio das concentrações obtidas a partir das estirpes de *S. cerevisiae* foi maior (830 ng/ μ L) comparativamente às outras espécies de leveduras (430 ng/ μ L). Independentemente do método, espécie ou estirpe o valor do rácio A_{260}/A_{280} situou-se no intervalo de 1,8-2,2 (Figura AIII-1 do Anexo III).

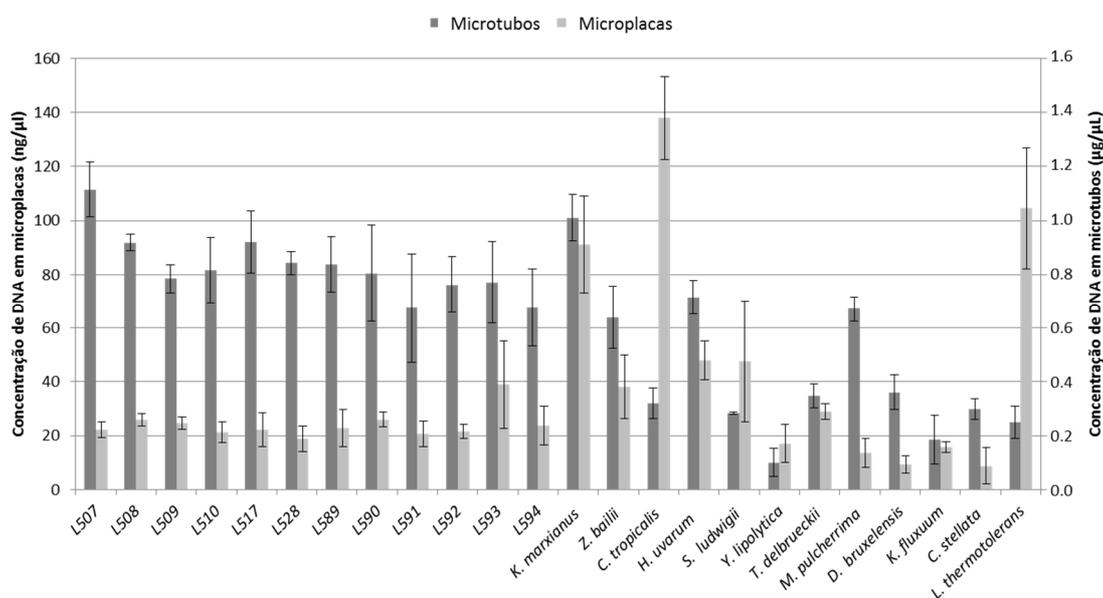


Figura III- 2: Concentrações de DNA obtidas para 12 espécies de leveduras e 12 estirpes de *S. cerevisiae*, usando diferentes escalas (microtubos μ g/ μ L; microplacas, ng/ μ L).

O rendimento do método apresentado está entre 1,2 e 2,3 μ g de DNA, a partir de 100 μ L de culturas crescidas durante 12 h. Estes valores consideram-se elevados em comparação com outras publicações que referem rendimentos de DNA 3 μ g a partir de 1,5 mL de volume de culturas crescidas no mesmo período de tempo, recorrendo ao método dos ciclos de congelamento/descongelamento (Harju et al., 2004), ou de 0,1 μ g/ 10^7 células usando o método LiOAc-SDS (Löoke et al., 2011).

O DNA obtido nas diferentes escalas de extração foi usado para amplificação de sequências interdelta (estirpes de *S. cerevisiae*) e da região ITS (espécies Não-*Saccharomyces*). A concentração de DNA, obtido pelo método de extração que utiliza os microtubos, foi ajustada a 20 ng/μL. Este procedimento não foi efetuado ao DNA obtido pelo método miniaturizado, uma vez que as concentrações finais se encontravam na gama considerada adequada para a amplificação (entre 10 e 140 ng/μL). A comparação dos perfis obtidos pela amplificação interdelta do DNA das seis estirpes de *S. cerevisiae* e a amplificação das sequências ITS do DNA de outras seis espécies de leveduras (Figura III-3A e III-3B), revelou que o método de extração aqui reportado não altera os perfis de amplificação. O mesmo foi observado na amplificação dos microsatélites polimórficos nas estirpes de *S. cerevisiae* (Tabela III-1).

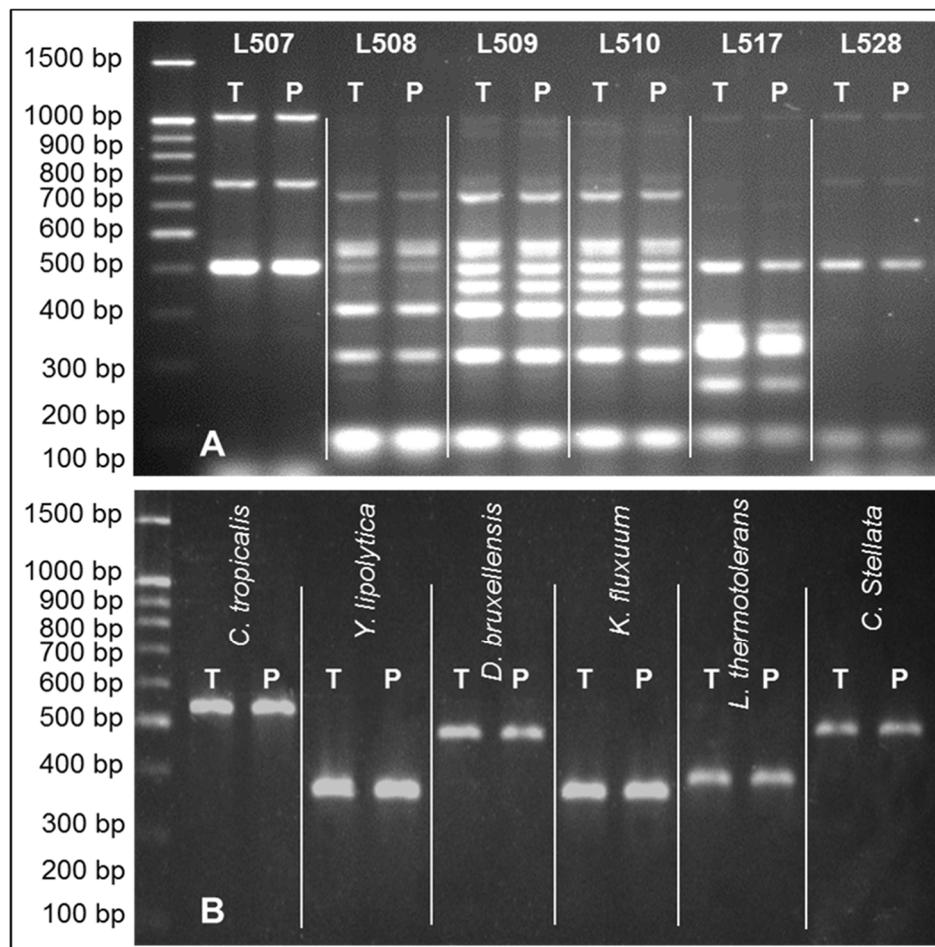


Figura III- 3: Comparação dos perfis obtidos por amplificação por PCR com DNA extraído usando microtubos (T) e microplacas (P); A) Amplificação de sequências interdelta do DNA obtido a partir das estirpes de *S. cerevisiae* L507, L508, L509, L510, L517, L528; B) Amplificação de sequências ITS das espécies de leveduras *C. tropicalis*, *Y. lipolytica*, *D. bruxellensis*, *K. fluxuum*, *L. thermotolerans* e *C. stellata*.

Tabela III- 1: Tamanho dos alelos de microssatélites (bp) de seis estirpes de *S. cerevisiae*.

Tamanho dos alelos (bp) das estirpes de <i>S. cerevisiae</i> L507 – L589													
Microssatélite	Alelo	Escala de Microtubo (1 mL)						Escala de Microplaca (100 µL)					
		L507	L508	L509	L510	L528	L589	L507	L508	L509	L510	L528	L589
ScAAT1	1	201	189	189	186	216	219	201	189	189	186	216	219
	2	201	189	201	186	219	220	201	189	201	186	219	220
ScAAT2	1	372	375	375	375	372	375	372	375	375	375	372	375
	2	372	375	375	375	378	375	372	375	375	375	378	375
ScAAT4	1	305	302	302	302	329	329	305	302	302	302	329	329
	2	305	302	329	302	329	329	305	302	329	302	329	329
ScAAT5	1	216	219	222	219	216	222	216	219	222	219	216	222
	2	216	222	222	222	219	222	216	222	222	222	219	222
ScAAT6	1	255	250	253	256	256	256	255	250	253	256	256	256
	2	255	250	255	256	259	256	255	250	255	256	259	256
C5-1	1	115	117	117	115	113	113	115	117	117	115	113	113
	2	133	125	125	124	129	131	133	125	125	124	129	131
C11-1	1	191	187	187	187	209	197	191	187	187	187	209	197
	2	191	211	211	211	211	197	191	211	211	211	211	197
YPL009	1	305	274	274	274	277	319	305	274	274	274	277	319
	2	305	286	286	286	277	319	305	286	286	286	277	319
YOR267c	1	335	305	311	311	289	324	335	305	311	311	289	324
	2	335	311	311	311	302	324	335	311	311	311	302	324

As ampliações por PCR de nove *loci* de microssatélites polimórficos, específicos *S. cerevisiae*, foram realizadas com DNA isolado a partir de seis estirpes de *S. cerevisiae*, extraído por ambos os métodos.

De seguida procedeu-se à extração do DNA, pelo método miniaturizado, de quatro réplicas independentes dos isolados congelados sem ajuste da concentração celular, a fim de avaliar a reprodutibilidade dos perfis electroforéticos. Para cada ensaio realizaram-se quatro réplicas independentes. Na Figura III-4A apresentam-se os resultados das ampliações interdelta para seis estirpes de *S. cerevisiae* e dos perfis RFLP (*Hinf* I) das regiões ITS do DNA de outras seis espécies de levedura (Figura III-4B). A reprodutibilidade dos perfis mostra que este ajuste não é necessário. Este resultado confirma observações anteriores (Figura III-3), que mostraram que as ampliações de DNA eram conseguidas dentro de um intervalo de concentrações de DNA que variava entre 10 e 140 ng/μL. Adicionalmente, as ampliações realizadas com este método otimizado foram mais reprodutíveis comparativamente com o método dos ciclos de congelamento/descongelamento (Harju et al., 2004) ou o método LiOAc-SDS (Löoke et al., 2011) (resultados não apresentados).

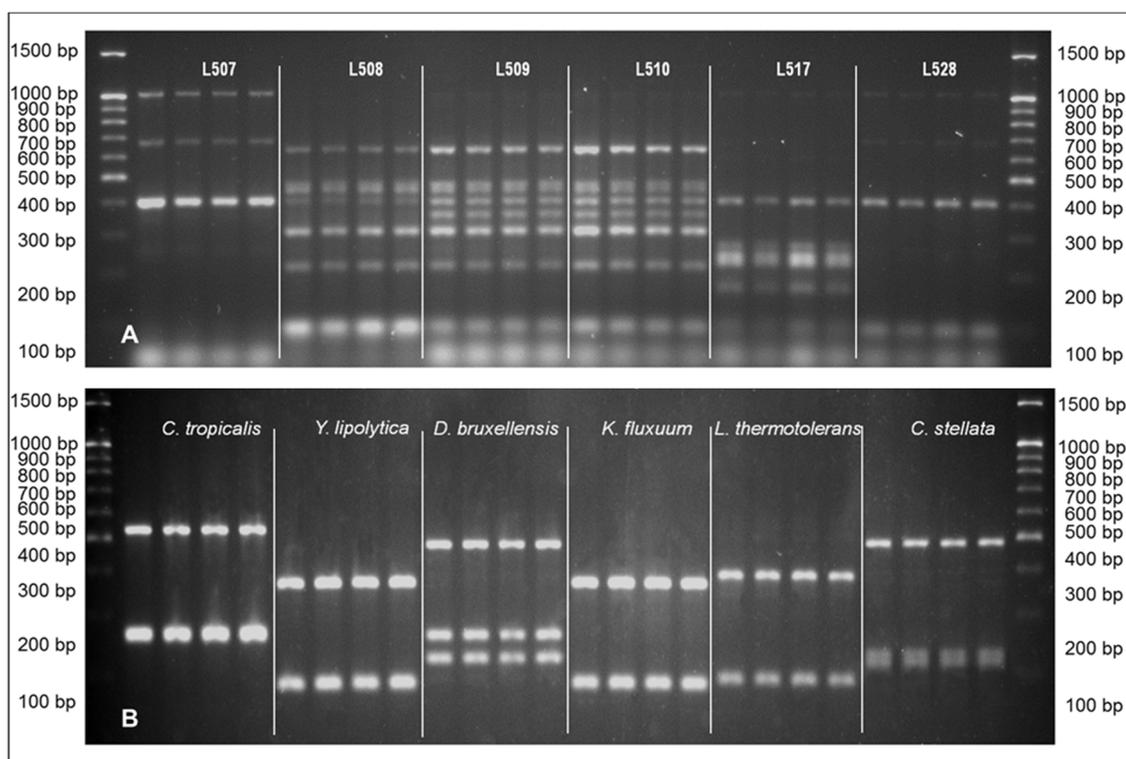


Figura III- 4: Reprodutibilidade de quatro réplicas independentes de ampliações a partir de DNA extraído pela abordagem das microplacas. A) Amplificação de seqüências interdelta de seis estirpes de *S. cerevisiae*. B) Perfis de ITS-RFLP das espécies de leveduras *C. tropicalis*, *Y. lipolytica*, *D. bruxellensis*, *K. fluxuum*, *L. thermotolerans* e *C. stellata*.

Os nossos resultados demonstraram que este método é adequado para o isolamento de DNA de várias espécies de leveduras. Pelo método miniaturizado foi extraído com sucesso o

DNA de mais outras 40 espécies de leveduras e de 3000 isolados de *S.cerevisiae* no âmbito de outros trabalhos nossos, e foram realizadas com êxito análises adicionais de tipagem molecular ou de sequenciação de DNA (resultados não apresentados).

O protocolo baseado no uso de microplacas permite obter o DNA de 1536 isolados de leveduras (16 microplacas) num dia de trabalho. Este aumento de oito vezes, comparativamente ao método original (Lopez et al., 2001), é possível devido à diminuição de escala e simplificação, e ainda porque podem ser encadeados oito conjuntos de duas microplacas em diferentes passos do protocolo, de modo que a média do tempo de extração para duas microplacas é de cerca de 1 h, quando se usa pipetas multicanal de repetição. Além disso, pode-se acelerar o processamento das amostras quando as coleções de isolados são guardadas e manuseadas em microplacas. Considerando que também não são necessários ajustes adicionais das concentrações de DNA, o método exposto é muito rápido.

Tendo em conta a informação disponível dos sistemas automatizados, a nossa abordagem é tão rápida como o LabTurbo 496 System (TAIGEN), que processa 384 amostras em 2 horas, e duas vezes mais rápido que o MagNA Pure 96 (Roche) e que o Fungal/Bacterial DNA Kit ZR-96 (Zymo Research), que permitem ambos 96 extrações de DNA em 40 a 60 min. Os custos de material e reagentes com o nosso método e para 192 extrações é de cerca de 3,98 €, enquanto o preço médio de um kit de extração de DNA, para o mesmo número de amostras, é cerca de 50 vezes superior.

Resumindo, o método de isolamento de DNA apresentado permite manusear uma média de 16 microplacas (1536 isolados) num dia de trabalho, sendo muito rápido, económico e apropriado para numerosas espécies de leveduras. A gama de concentração final de DNA (20 a 50 ng/ μ L) é apropriada para utilização sem ajustes adicionais de concentração, para métodos de tipagem molecular que são usados na identificação de leveduras ou na delimitação de estirpes de *S. cerevisiae*.

Agradecimentos

Eugénia Vieira e João Drumonde Neves são beneficiários de bolsas de estudo (Vinalia e FCT (SFRH / BDE / 33672/2009); DRCT (M321 / 006 / F / 2008) e PROEMPREGO, respetivamente). Este trabalho foi suportado por fundos FEDER através do programa COMPETE e por fundos nacionais através da FCT pelos projetos FCOMP-01-0124-008775 e PTDC / AGR-ALI / 103392/2008 e PTDC / AGR-ALI / 121062/2010 e ainda pelo POFC (Programa Operacional Factores de Competitividade)-COMPETE e fundos da FCT no âmbito do projecto PEst – C/BIA/UI4050/2011. A investigação conducente a estes resultados também recebeu financiamento no âmbito do projeto TRANSBIO do Programa da Comunidade Europeia Sétimo Quadro de trabalho (FP7 / 2007-2013 convenção de subvenção No. 289603).

CAPÍTULO IV

**SELEÇÃO DE ESTIRPES VÍNICAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
ISOLADAS EM PORTUGAL**

RESUMO

Este trabalho reporta a genotipagem e caracterização enológica de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, isoladas a partir de amostras pertencentes a seis regiões vitivinícolas portuguesas, assim como a seleção de leveduras para aplicação em fermentações industriais. Foram recolhidas 66 amostras de uvas de diferentes castas (*Aragonês*, *Avesso*, *Baga*, *Castelão*, *Loureiro* e *Touriga Nacional*) nas regiões vitivinícolas portuguesas dos Vinhos Verdes, do Dão, do Douro, da Bairrada, Tejo e do Alentejo. No final das fermentações espontâneas dos mostos foram obtidos 1500 isolados de leveduras e a tipagem molecular permitiu diferenciar 64 estirpes de *S. cerevisiae*. A caracterização enológica foi efetuada recorrendo a testes fenotípicos qualitativos (resistência ao SO₂, tolerância ao etanol, fenómeno *killer*, potencial de produção de H₂S e atividade β- glucosidásica) e a microfermentações de mosto de *Loureiro* e *Avesso* da região dos Vinhos Verdes. Verificou-se que a maioria das estirpes tolera 14% (v/v) de etanol, consegue crescer em 100 mg/L de SO₂, tem produção intermédia ou baixa de H₂S e tem uma atividade β-glucosidásica média ou baixa. Apenas uma estirpe foi classificada com atividade *killer* (K) e as restantes revelaram-se neutras (N). A seleção das estirpes envolveu a análise sequencial dos seguintes critérios enológicos: duração total da fermentação, perfil organolético, resistência ao sulfuroso (SO₂), tolerância ao etanol, fenómeno *killer*, potencial de produção de sulfureto de hidrogénio (H₂S), actividade β-glucosidásica, e concentração de metabolitos (etanol, glicerol e ácido acético) no final da fermentação, assim como concentração de açúcares residuais (glucose e frutose). Das 64 estirpes, apenas 49 iniciaram a vinificação do mosto de *Loureiro* e *Avesso*. Destas, foram selecionadas as que fermentaram num tempo igual ou inferior ao da estirpe de referência (Lalvin QA23®) e que simultaneamente apresentaram apenas descritores aromáticos positivos, reduzindo o número de estirpes para 13. De seguida, a análise dos testes fenotípicos restringiu a três o número de estirpes em análise. Finalmente, a interseção dos resultados da análise química (frutose, glucose, etanol, glicerol e ácido acético) aos vinhos obtidos com a duração da fermentação e análise organolética, permitiu selecionar a estirpe D3. Esta produziu um vinho com aroma a frutos tropicais, 6,4 g/L de glicerol e 13,6% (v/v) de etanol. Observou-se ainda que as estirpes que atingiram a fase final da seleção foram obtidas a partir das amostras compostas (constituídas por volumes iguais de mostos obtidos a partir de uvas provenientes de diferentes locais da mesma vinha). Este resultado sugere que estas estirpes possuem características enológicas mais competitivas.

1 INTRODUÇÃO

As características sensoriais do vinho são influenciadas por vários fatores como casta(s), *terroir* (clima, solo e topografia), práticas de vitivinicultura, estado de maturação e qualidade fitossanitária das uvas, técnicas de vinificação, leveduras envolvidas no processo, e reações químicas durante o armazenamento (Bisson and Karpel, 2010; Romano et al., 2003; Styger et al., 2011). O vinho resulta da fermentação alcoólica de mosto de uvas. Trata-se de um processo complexo conduzido por leveduras que convertem o açúcar em etanol, dióxido de carbono e outros subprodutos, as quais podem contribuir positivamente ou negativamente para o perfil organolético do vinho (Zamora, 2009). Na fermentação alcoólica as leveduras metabolizam os constituintes do mosto originando uma vasta gama de compostos voláteis e não voláteis (ácidos, álcoois, ésteres, compostos carbonados e compostos sulfurosos) que influenciam o perfil organolético. Além disso, as leveduras produzem enzimas capazes de converter os precursores do aroma presentes na forma não volátil (conjugados glicosídicos e de cisteína/glutaciona), libertando os compostos voláteis (terpenos e tióis) (Fleet, 2008; Pretorius et al., 2012; Styger et al., 2011). Nas fermentações espontâneas, a conversão do mosto em vinho é realizada pelas leveduras presentes na superfície das uvas ou no interior da adega, ocorrendo uma sucessão de diferentes espécies ao longo do processo. Inicialmente dominam as leveduras não-*Saccharomyces*, que entram em declínio a partir do meio da fermentação e são ultrapassadas pelo crescimento das leveduras do género *Saccharomyces* (maioritariamente da espécie *S. cerevisiae*), que terminam a fermentação (Fleet, 2008).

A espécie *S. cerevisiae* é cosmopolita, na medida em que habita vários nichos naturais e domesticados (florestas, frutos, vinho, cerveja, pão, *sake*), tem uma distribuição global, e os seus isolados incluem numerosas estirpes 'mosaico' que provavelmente refletem a dispersão recente associada ao cruzamento e à ação humana (Fay and Benavides, 2005; Hittinger, 2013; Liti et al., 2009). A análise da diversidade genética de uma coleção de estirpes de *S. cerevisiae* isoladas em diferentes locais do globo, de vários nichos ecológicos e diferentes processos fermentativos, revelou a história evolutiva das populações domesticadas (Sicard and Legras, 2011). Geneticamente, as estirpes de leveduras agrupam-se preferencialmente de acordo com os seus nichos ecológicos e tipo de fermentação ao invés da sua origem geográfica (Fay and Benavides, 2005; Legras et al., 2007; Liti et al., 2009; Schacherer et al., 2009), o que sugere que os eventos

de domesticação ocorreram de forma independente, e que o fluxo genético entre nichos e processos fermentativos foi restrito (Sicard and Legras, 2011).

A grande diversidade de estirpes de leveduras vínicas *S. cerevisiae* deve-se à sua elevada aptidão para alterações do genoma, e as diferenças genéticas relacionam-se frequentemente com diferenças nas propriedades enológicas e tecnológicas (Sipiczki, 2010). A plasticidade do genoma promove rápidas adaptações em resposta a mudanças ambientais (Libkind et al., 2011), conferindo às populações de leveduras vínicas capacidade para se adaptarem às mudanças constantes e ao ambiente fermentativo bastante adverso (Sipiczki, 2010). No entanto, a instabilidade genética das leveduras vínicas pode alterar propriedades enológicas e tecnológicas úteis, resultando em problemas de fermentação ou vinho com pouca qualidade (Sipiczki, 2010). A variabilidade imprevisível da população de leveduras na fermentação espontânea levou os produtores a adotar práticas de controlo da fermentação. A partir da década de 70 os produtores de vinho começaram a adicionar dióxido de enxofre (SO₂) ao mosto de modo a impedir o desenvolvimento das leveduras autóctones, e a inocular culturas puras de estirpes de *S. cerevisiae* selecionadas, garantindo o controlo do processo fermentativo e a homogeneidade das características do vinho ao longo dos anos de produção (Capece et al., 2012; Rodríguez et al., 2010; Schuller and Casal, 2005). Atualmente este procedimento está generalizado, revestindo-se de grande importância a obtenção de estirpes geneticamente estáveis e com propriedades enológicas conhecidas (Sipiczki, 2010).

Inicialmente, a seleção das estirpes de leveduras vínicas era efetuada em função da sua capacidade para fermentar completamente concentrações de açúcar muito elevadas (200 g/L) num ambiente maioritariamente anaeróbio (Rossouw et al., 2012a). Outras características como os requisitos nutricionais (ex. azoto) apropriados ao mosto, a tolerância ao etanol e à temperatura de fermentação, a resistência ao SO₂ e a compatibilidade com outros microrganismos presentes, são indissociáveis do sucesso da fermentação. Para além destas propriedades fundamentais, têm sido utilizados critérios de seleção com impacto no perfil organolético do vinho, como por exemplo a produção diminuta de sulfureto de hidrogénio (H₂S) e de ácido acético. O aroma do vinho, apesar de ser uma característica subjetiva, tem direcionado a domesticação e seleção das estirpes de leveduras vínicas (Cordente et al., 2012; Hyma et al., 2011; Pretorius, 2000). De facto, demonstrou-se recentemente que embora estirpes de *S. cerevisiae* isoladas em ambientes não vitícolas também sejam capazes de fermentar o mosto, nos vinhos resultantes identificam-se descritores aromáticos de terra e enxofre, enquanto os vinhos produzidos com estirpes vínicas apresentam características florais e frutadas (Hyma et

al., 2011). A evolução das tecnologias na análise de compostos químicos e na biologia molecular (genômica, transcritômica, proteômica e metabolômica) permite constantes avanços na compreensão da funcionalidade das estirpes em condições de fermentação diferentes (OIV, 2012). O conhecimento da vasta influência das leveduras nas propriedades sensoriais do vinho acrescentou critérios relativos à cor, ao aroma e ao sabor na seleção de estirpes (Cordente et al., 2012; Suárez-Lepe and Morata, 2011). Assim, pode avaliar-se a capacidade da estirpe para melhorar a cor através da formação metabólica de pigmentos estáveis (ex. vitisinas, formadas a partir da ligação das antocianinas com o ácido pirúvico e acetaldeído, e vinilflavonolpiranoantocianinas, formadas pela ligação das antocianinas com compostos vinilfenólicos produzidos por ação enzimática), escolher estirpes com baixa taxa de adsorção de antocianinas e com baixa atividade da β -glucosidase para prevenir a degradação da cor nos vinhos tintos (OIV, 2012; Suárez-Lepe and Morata, 2011). A seleção de estirpes com maior capacidade de produção de polióis como o glicerol e o 2,3 – butanodiol, contribui positivamente para o corpo, a estrutura, a suavidade e a doçura do vinho (OIV, 2012; Suárez-Lepe and Morata, 2011). Durante o processo de envelhecimento dos vinhos tintos nas borras, os polissacáridos libertados facilitam a estabilização coloidal e da cor, e aumentam a densidade do vinho, conferindo maior suavidade e melhor integração de taninos, sendo portanto desejável a escolha de estirpes que aumentem a libertação destes compostos (OIV, 2012; Suárez-Lepe and Morata, 2011). Relativamente ao aroma é importante selecionar estirpes que formem compostos voláteis, como ésteres e álcoois superiores, em concentrações adequadas às castas e tipo de vinho que se pretende produzir, e que simultaneamente não originem aromas indesejáveis (acetaldeído, ácido acético, H_2S e mercaptanos) (OIV, 2012; Suárez-Lepe and Morata, 2011). Adicionalmente é desejável que as estirpes produzam enzimas, como a β -glucosidase e β -liase, que aumentam a libertação dos terpenos (ex. geraniol, linalol) e dos tióis polifuncionais (ex. 4-mercapto-4-metilpentano-2-ona, 4MMP, 3-mercaptohexano-1-ol, 3MH, e o 3-mercaptohexilacetato, 3MHA), respetivamente (Cordente et al., 2012; OIV, 2012).

Cada estirpe possui um conjunto exclusivo de características enológicas, por isso quando se pretende efetuar a seleção para conduzir uma fermentação particular, o número de ensaios a executar é enorme o que torna o processo muito trabalhoso (Pulvirenti et al., 2009). A relevância de cada característica varia de acordo com o tipo e estilo de vinho a produzir (OIV, 2012; Regodon et al., 1997), por isso muitas vezes opta-se por testar apenas alguns parâmetros chave com o objetivo de encurtar o processo (Pulvirenti et al., 2009; Regodon et al., 1997; Rodríguez et al., 2010).

O consumo mundial de vinho está a aumentar na Ásia, América e Europa de Leste, e a produção de vinho a alargar-se a países não tradicionais como a China, a Índia e o Brasil. De acordo com o CCE (Comité national conseillers du commerce extérieur de la France), em 2050 o consumidor de vinho será ocasional e pouco fiel, de diferentes origens geográficas e culturais e procurará vinhos diversificados e sofisticados (CCE, 2009). Esta tendência já se observa atualmente, o consumidor é exigente, procura novos estilos de vinho e produzidos de uma forma sustentável (Bisson et al., 2002; Fleet, 2008; Pretorius and Høj, 2005; Swiegers et al., 2006a). O enólogo quando decide o estilo de um determinado vinho tem que considerar muitos fatores. Pode optar por produzir um vinho que satisfaça as características desejadas por um mercado específico, um vinho que melhor represente a região de origem, um vinho de “assinatura” ou uma combinação destes (Chambers et al., 2009b). Os processos tecnológicos de produção são limitados quando se quer alterar o estilo de um vinho de uma colheita para a outra mas a escolha da levedura certa pode ser a solução simples e eficaz (Chambers et al., 2009b; Pretorius et al., 2012).

Apesar da maioria das estirpes de leveduras vínicas disponíveis comercialmente terem sido isoladas por prestigiados institutos de investigação e selecionadas pelas suas características tecnológicas positivas, a sua utilização em diferentes castas e em vinhos de diferentes origens pode ser inapropriado, na medida em que as características individuais das leveduras podem uniformizar o perfil aromático do produto final, mascarando as propriedades que distinguem e tipificam os vinhos de um determinado local (Cappello et al., 2004; Rodríguez et al., 2010; Romano et al., 2008). Ao longo dos últimos anos tem sido defendido que a utilização de estirpes autóctones de *S. cerevisiae*, por se terem adaptado às condições ambientais locais, nomeadamente, clima, solo, castas de uvas, práticas agrícolas, pode imprimir características que se identificam com a tipicidade de um determinado local (Cappello et al., 2004; Csoma et al., 2010; Esteve-Zarzoso et al., 2000; Nikolaou et al., 2006; Romano et al., 2008).

Estudos de biodiversidade de leveduras vínicas, enquadrados numa perspetiva ecológica, são essenciais para encontrar estirpes com novos atributos moleculares e enológicos (Capece et al., 2012). Trabalhos realizados anteriormente permitiram caracterizar leveduras isoladas, por exemplo, nas vinhas das regiões: de “El Penedès” (Esteve-Zarzoso et al., 2000), do Tenerife (González et al., 2007), de “Serranía de Ronda” (Clavijo et al., 2010), em Espanha; dos Vinhos Verdes (Schuller et al., 2005), em Portugal; da Sicília, nas castas Nero d'Avola (Capece et al., 2010b) e Inzolia (Capece et al., 2011), e do parque nacional Cinque Terre (Capece et al.,

2012), na Itália; da Malokarpatská e da Juznoslovenská (Kráková et al., 2012), na Eslováquia; entre outras.

Portugal tem 14 Regiões Vitivinícolas com diferentes características climáticas e de composição do solo, e possui uma grande biodiversidade de castas, estando autorizado oficialmente o cultivo de 341 (Almadanim et al., 2007). Existe portanto uma grande variedade de *habitats*, favorecendo a ocorrência de diferentes estirpes de *S.cerevisiae* adaptadas às condições locais. No âmbito de estudos anteriores (Schuller and Casal, 2007; Schuller et al., 2005; Valero et al., 2007) foi demonstrada a elevada diversidade genética das estirpes de *S. cerevisiae* e a ocorrência de isolados característicos para diferentes sub-regiões da Região dos Vinhos Verdes. No entanto, apesar de Portugal ser um país com uma longa tradição como produtor de vinho, apenas são comercializadas 3 estirpes de leveduras vínicas, que foram isoladas nas regiões do Vinhos Verdes, Bairrada e Dão.

Neste trabalho pretendeu-se avaliar o potencial enológico de estirpes de *S. cerevisiae* isoladas em seis regiões vitivinícolas portuguesas para aplicação em fermentações industriais. Após a caracterização genotípica e enológica das estirpes, verificou-se a eficácia de uma abordagem simplificada de seleção de leveduras tendo como finalidade reduzir o número de testes envolvidos no processo. Foi ainda analisada a possibilidade de reduzir do número de estirpes, comparando o comportamento enológico das isoladas a partir de dois tipos de amostras (compostas e não compostas).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PLANO DE AMOSTRAGEM E OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS

A recolha das amostras de uvas efetuou-se durante a vindima de 2009 em 11 vinhas pertencentes a 6 regiões vitivinícolas portuguesas (Alentejo, Bairrada, Dão, Porto e Douro, Tejo e Vinhos Verdes) conforme indicado na Figura IV-1. Em cada vinha colheu-se em condições assépticas, 2 Kg de uvas em cada um de 6 pontos de amostragem, definidos de acordo com a geografia da área. A distância entre os pontos de amostragem e a adega foi superior a 50 m. No total, recolheram-se 66 amostras de uvas pertencentes às castas tintas de *Aragonês*, *Baga*, *Castelão*, e *Touriga Nacional* e brancas de *Loureiro* e *Avesso* (Figura IV-1).

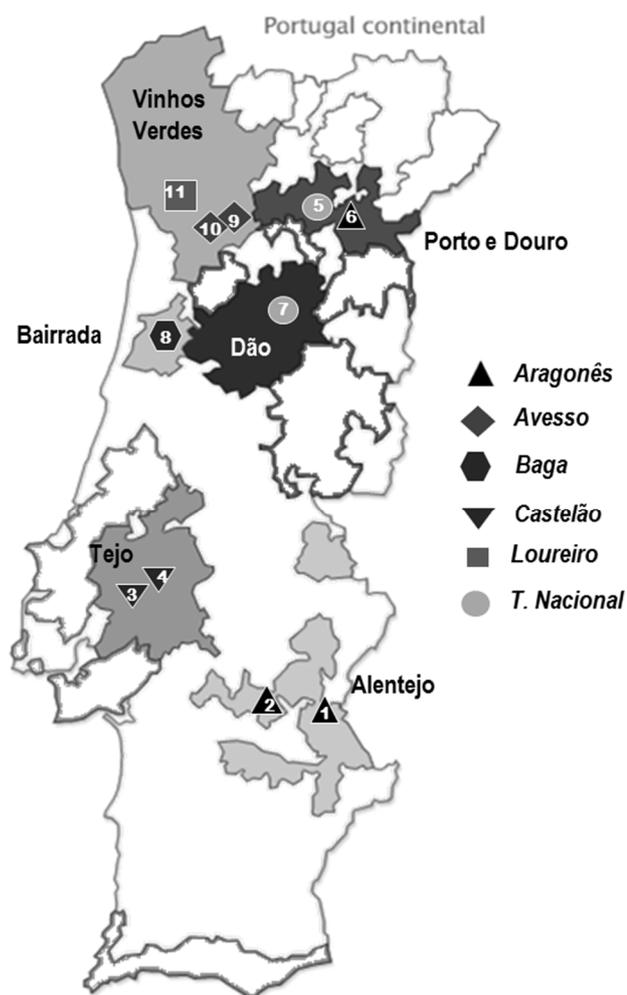


Figura IV- 1: Localização geográfica das 11 vinhas do plano de amostragem e as castas de uva correspondentes.

As amostras foram transportadas para o laboratório em malas térmicas refrigeradas. Após o esmagamento das uvas de cada amostra, que foi efetuado nos sacos da colheita, o mosto resultante foi transferido para um balão Erlenmeyer estéril de 500 mL, tapado com rolha previamente flamejada e na qual foi colocada uma agulha estéril para permitir a libertação de CO₂. As fermentações espontâneas realizaram-se num intervalo de temperatura de 21±1 °C. Adicionalmente, para cada vinha, foram realizadas fermentações espontâneas com amostras compostas por 100 mL de mosto de cada um dos seis pontos de amostragem, perfazendo no total 77 fermentações. A monitorização das fermentações foi efetuada pela determinação diária da perda de massa do mosto, que corresponde à produção de CO₂. Quando se atingiu uma redução de 70 g/L, ou seja, aproximadamente dois terços do açúcar inicialmente presente foi consumido, retirou-se uma alíquota que foi diluída e espalhada em meio YPD (1% de extrato de levedura, p/v; 1% de peptona, p/v; 2% de glucose, p/v; e 2% de agar, p/v) ao qual foi adicionado

bifenil (150 mg/L) e cloranfenicol (50 mg/L) para inibição do crescimento de fungos filamentosos e bactérias, respetivamente. Após dois dias de incubação a 30 °C, isolaram-se aleatoriamente 30 colónias de cada fermentação, que após repicagem em placas de meio YPD, foram armazenadas em glicerol (30%, v/v) a -80 °C.

2.2 ISOLAMENTO DE DNA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Inoculou-se uma pequena alíquota (5 µL) de cada isolado de levedura, congelado nas condições referidas no ponto anterior, em 1 mL de meio líquido YPD. Após incubação (12 h, 30 °C, 200 rpm), o isolamento de DNA foi executado de acordo com um método previamente descrito (Lopez et al., 2001) com ligeiras modificações (ver Capítulo III, método que utiliza microtubos). O método que utiliza microplacas, exposto no Capítulo III, só foi validado posteriormente. Assim, as culturas resultantes do crescimento foram sujeitas a centrifugação (1 min, 16200 g/13000 rpm) e o sedimento ressuspendido em 100 µL de tampão de digestão (sorbitol 1 M, EDTA-Na₂ 0,1 M, pH 7,5), contendo 8 µL de uma solução de liticase a 3,3 U/µL (Sigma, Ref. L4025), adicionada ao tampão imediatamente antes da sua distribuição. Após incubação (30 minutos, a 37 °C), adicionou-se 100 µL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, EDTA-Na₂ 20 mM, SDS 0,35 M, pH 7,4), e procedeu-se à sua incubação num banho a 65 °C durante 5 minutos. Adicionou-se imediatamente uma solução de acetato de potássio (5 M, 80 µL) e colocou-se a -20 °C durante 5 - 10 min para a precipitação das proteínas. Após a centrifugação (4 °C, 15 min, 16200 g/13 000 rpm), o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo contendo 250 µL de isopropanol, para a precipitação do DNA à temperatura ambiente durante 5 minutos, seguindo-se outra centrifugação (1 min, 16200 g/13 000 rpm). O precipitado contendo DNA foi lavado com 500 µL de etanol 70% (v/v), e posteriormente submetido a secagem ao ar. O sedimento foi então dissolvido em 50 µL de TE (Tris-HCl 1 mM, EDTA-Na₂ 0,1 mM, pH 7,5), diluído de 1:10. A concentração de DNA foi quantificada por espectrofotometria (NanoDrop™ ND-1000, Thermo Fisher Scientific), sendo posteriormente ajustada a 20 ng/µL. A diferenciação das estirpes de *S. cerevisiae* foi efetuada pela amplificação dos segmentos entre as sequências delta, num termociclador Bio-Rad iCycler, usando os *primers* $\delta 2$ (5'-GTGGATTTTTATTCCAAC-3') e $\delta 12$ (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3'), anteriormente descritos (Legras and Karst, 2003; Schuller et al., 2004). A mistura de reação de amplificação (10 µL), contendo 10-40 ng de DNA, 0,5 U de Taq polymerase (MBI Fermentas), Taq buffer (10 mM TrisHCl, 50 mM KCl, 0.08% Nonidet P-40) (1x), 15 pmol de cada *primer*, 0,4 mM de mistura de dNTP e 3 mM MgCl₂, foi submetida às condições anteriormente descritas (Schuller et al, 2004). Os produtos da amplificação foram diluídos (1:4) e separados por eletroforese, num gel de

agarose a 1,5% (p/v) contendo 0,0016% (v/v) de GelRed™, a 100 V em tampão TAE (1x). Os perfis obtidos foram visualizados e fotografados num transiluminador de UV (BioRad ChemiDoc XRS). Considerou-se que o conjunto de isolados que partilhavam o mesmo perfil correspondia à mesma estirpe de *S. cerevisiae*, escolhendo-se um isolado representativo de cada uma.

2.3 CARACTERIZAÇÃO ENOLÓGICA E FENOTÍPICA

2.3.1 Testes fenotípicos

Os testes fenotípicos foram realizados com as 64 estirpes de *S. cerevisiae*, diferenciadas a partir dos 1500 isolados obtidos a partir das fermentações espontâneas mencionadas anteriormente. A estirpe comercial Lalvin QA23® (Lallemand) foi utilizada como referência.

De forma a garantir que todas as culturas utilizadas nos testes fenotípicos tinham uma densidade celular idêntica, efetuaram-se pré-inóculos e procedeu-se ao acerto densidade ótica (D.O.). As culturas foram inoculadas em 50 mL de meio líquido EM (extrato de malte 3%, p/v; peptona, 0,5%, p/v), durante 48 h a 30 °C e 200 rpm. Após a leitura da D.O._{550 nm}, centrifugaram-se as culturas celulares (5 min, 2250 g/4000 rpm) e os sedimentos ressuspensos numa solução de glicerol a 30% (v/v), de modo a obter um valor de D.O._{550 nm} de 10,0. As culturas foram armazenadas em microplacas a -80 °C, contendo 100 µL de cada suspensão celular. Para a realização dos testes fenotípicos, as diferentes suspensões celulares foram diluídas em meio EM de forma a obter uma D.O._{550 nm} 1,0. As suspensões celulares foram incubadas à temperatura ambiente durante 1 h, de forma a recuperarem dos eventuais efeitos da diferença térmica, antes de serem submetidas aos testes de tolerância ao etanol, de resistência ao dióxido de enxofre (SO₂), do potencial da produção sulfureto de hidrogénio (H₂S), do fenómeno *killer* e da avaliação da atividade β- glucosidásica. Do mesmo modo, cresceram-se culturas celulares em meio líquido YPD e prepararam-se pré-inóculos com D.O._{550 nm} final de 100,0 para usar nas microfermentações.

2.3.1.1 Tolerância ao etanol

Os testes de tolerância ao etanol foram efetuados num meio Malt Extract agar (MEA, Fluka), preparado com diferentes concentrações de etanol (12, 14, 16 e 18%, v/v) e 50 mg/L de SO₂. O meio MAE foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. Após a esterilização, e ajuste do pH 3,2 com uma solução de HCl (2N), adicionou-se 0,49% (v/v) de uma solução de metabissulfito de sódio (Na₂S₂O₅), 0,08 M, de modo a obter uma concentração de 50 mg/L de SO₂. Por fim, fez-se com etanol absoluto de forma a obter as concentrações referidas

anteriormente. O meio MEA com 50 mg/L de SO₂ e sem adição de etanol foi utilizado como controlo. Adicionou-se uma gota de 2 µL de cada suspensão celular às placas com diferentes concentrações de etanol a testar. Após incubação durante 2 dias a 30 °C observou-se e registou-se o crescimento celular.

2.3.1.2 Resistência ao dióxido de enxofre

As culturas celulares foram testadas em meio MEA com diferentes concentrações de SO₂ (50, 75 e 100 mg/L) e 12% (v/v) de etanol. Após a esterilização, ajustou-se o pH 3,2 (HCl 2N), e adicionou-se o volume correspondente de etanol absoluto de modo a obter uma concentração final de 12% (v/v). De seguida, acrescentou-se 0,49, 0,79 e 0,99% (v/v) da solução de 0,08 M de metabissulfito de sódio (Na₂S₂O₅), para fazer os meios com 50, 75 e 100 mg/L de SO₂, respetivamente. O meio MEA com 12% (v/v) de etanol e sem adição de metabissulfito de sódio foi usado como controlo. Para observar o fenótipo das diferentes estirpes procedeu-se como descrito em 2.3.1.1.

2.3.1.3 Potencial de produção de sulfureto de hidrogénio

A avaliação do potencial de produção sulfureto de hidrogénio (H₂S) foi determinada usando o meio BiGGy agar (Fluka). O meio de cultura foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. Adicionou-se 1 gota de 5 µL de cada suspensão celular, e as placas foram incubadas a 30 °C durante 2 dias. Avaliou-se a capacidade de cada estirpe reduzir os sulfitos a sulfuretos pela alteração da cor da colónia, em resultado da combinação do bismuto (presente no meio BiGGy) com os sulfuretos produzidos. Esta reação confere uma cor castanha à colónia desenvolvida, sendo esta mais escura quanto maior for a capacidade de produzir sulfuretos. A interpretação dos resultados foi efetuada por quatro classificações qualitativas: cor branca – sem produção (0); cor bege – baixa produção (1); cor castanha – produção intermédia (2) e cor castanho escuro – produção elevada (3).

2.3.1.4 Fenómeno killer

Foram qualificadas como *killer* (K) as estirpes que libertam toxinas proteicas capazes de matar estirpes designadas como sensíveis (S). As qualificadas como neutras (N) são resistentes às toxinas embora não as produzam. Estes testes foram efetuados em dois meios MEA com 0,003% (p/v) de azul de metileno, 5% (v/v) de tampão citrato 1 M, a pH 3,9, um incorporado com a estirpe de referência CECT 1415 (S) e outro com a estirpe de referência CECT 1182 (K), com concentração final de aproximadamente 10⁴ células/mL de cada estirpe. A cada meio adicionou-se 1 gota de 2 µL de todas as suspensões celulares, e as placas foram incubadas a 30 °C

durante 2 dias. As estirpes que possuem atividade neutra e *killer* apresentaram crescimento em ambos os meios, distinguindo-se as *killer* pela criação de uma zona de inibição circundante à colónia, no meio preparado com a estirpe de referência CECT 1415 (S). As estirpes sensíveis à toxina da estirpe de referência CECT 1182 (K) só apresentaram crescimento no meio preparado com a estirpe de referência CECT 1415 (S).

2.3.1.5 Atividade β -glucosidásica

A atividade β -glucosidásica foi estimada através do inóculo de 2 μ L de cada suspensão celular num meio de cultura de Esculina Glicerol Agar (esculina 1 g/L, cloreto de ferro 0,3 g/L, hidrolisado de caseína 1 g/L, extrato de levedura 25 g/L, glicerol 8 mL/L, agar 20 g/L e pH final de 6,0) (Pérez et al., 2011). As placas de petri foram colocadas a 25 °C durante 2 dias. As estirpes com atividade β -glucosidásica hidrolisaram a esculina e desenvolveu-se um halo castanho escuro no meio circundante à colónia, com um tamanho que variou proporcionalmente à atividade da enzima. A classificação da atividade foi efetuada de acordo com quatro categorias qualitativas (sem atividade, 0; baixa atividade, 1; atividade intermédia, 2, e atividade elevada, 3).

2.3.2 Microfermentações

As microfermentações foram conduzidas num mosto constituído por duas castas de uvas brancas, *Loureiro* e *Avesso* na proporção aproximada de 50%/50% (v/v). A vindima foi realizada em 2010, e após o desengace, esmagamento e prensagem das uvas, adicionou-se 30 mg/L de metabissulfito de potássio ao mosto extraído. Depois de clarificado durante 48 h a 4 °C, foi congelado até à realização dos ensaios. O mosto apresentava as seguintes características: 225,6 g/L de açúcar fermentável, pH 3,56 e acidez total de 6,2 g/L, determinados por HPLC (2.3.3), potenciometria e *kit* de acidez total Reflectoquant (Ref. 1.16135.0001, Merk), respetivamente. Realizaram-se microfermentações com as 64 estirpes e a estirpe comercial usada como referência (Lalvin QA23®, Lallemand), em 100 mL de mosto, pré-filtrado com membranas de microfibras de vidro (Millipore), seguido de esterilização com membranas de porosidade 0,45 μ m (Millipore). O mosto foi distribuído por balões Erlenmeyer estéreis de 100 mL, tapados com rolhas previamente flamejadas, com uma agulha estéril para permitir a libertação de CO₂. O inóculo de cada uma das culturas celulares foi efetuado de modo a obter uma concentração aproximada de 10⁶ células/mL, utilizando os pré-inóculos preparados como descrito em 2.3.1. As microfermentações realizaram-se a 18 °C, com agitação de 70 rpm. A monitorização efetuou-se por pesagens diárias até cessar a produção de CO₂, o que foi evidente

pelo valor constante da massa. As microfermentações que não terminaram em 50 dias foram descartadas.

2.3.3 Análises químicas dos vinhos

A quantificação da frutose, glucose, etanol, glicerol e ácido acético, efetuou-se por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), num equipamento Hitachi Elite LaChrome (USA). As amostras foram filtradas (filtros de seringa de porosidade 0,2 µm, VWR) e analisadas em duplicado por injeção de volumes de amostra de 20 µL. A separação isocrática das amostras foi executada utilizando como fase móvel o ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 2,5 mM, com um caudal de 0,5 mL/min dos 0 aos 9 min, 0,25 mL/min dos 10 aos 14 min e 0,50 mL/min dos 15 aos 35 min, numa coluna de troca iónica Aminex HPX-87H a 60 °C. Os compostos de eluição detetaram-se por índice de refração (RI), a 40 °C. A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos seus tempos de retenção com o dos padrões, e a quantificação da área dos picos gerados permitiu determinar a concentração dos compostos, utilizando uma curva de calibração.

2.3.4 Prova organolética olfativa

A prova organolética olfativa foi realizada por um pequeno painel de 3 pessoas treinadas, pertencentes ao grupo de trabalho, que fizeram uma avaliação qualitativa com 25 mL de amostra de vinho, em copos apropriados para o efeito. Esta avaliação utilizou os descritores positivos (frutado, frutos tropicais, citrinos, frutos secos, frutos de árvore, floral e mel) e negativos (vegetal, sabão, sulfídrico, oxidado, láctico, levedura e balsâmico).

3 RESULTADOS

Durante a vindima de 2009, recolheram-se 66 amostras de uvas de diferentes castas portuguesas (*Aragonês, Avesso, Baga, Castelão, Loureiro e Touriga Nacional*) em 11 vinhas distribuídas por seis das regiões vitivinícolas portuguesas mais relevantes (Alentejo, Bairrada, Dão, Porto e Douro, Tejo e Vinhos Verdes), conforme resumido na Tabela IV-1.

Tabela IV- 1: Resumo do número estirpes de *S. cerevisiae* obtidas a partir dos isolados de levedura recolhidos no final das fermentações espontâneas, realizadas com várias castas de diferentes regiões vitivinícolas.

Região	Castas	Localização (Figura IV-1)	Nº de amostras recolhidas	Nº de amostras (incluindo compostas)	Nº de fermentações espontâneas	Nº de isolados recolhidos	Nº de estirpes de <i>S. cerevisiae</i>
Vinhos Verdes	<i>Avesso</i>	9 e 10	12	14	4	120	5
	<i>Loureiro</i>	11	6	7	7	210	5
	Total		18	21	11	330	10
Bairrada	<i>Baga</i>	8	6	7	5	150	5
	Total		6	7	5	150	5
Alentejo	<i>Aragonês</i>	1 e 2	12	14	9	270	7
	Total		12	14	9	270	7
Tejo	<i>Castelão</i>	3 e 4	12	14	9	270	9
	Total		12	14	9	270	9
Porto e Douro	<i>Aragonês</i>	5	6	7	6	180	9
	<i>Touriga Nacional</i>	6	6	7	3	90	4
	Total		12	14	9	270	13
Dão	<i>Touriga Nacional</i>	7	6	7	7	210	20
	Total		6	7	7	210	20
Total			66	77	50	1500	64

Realizaram-se fermentações espontâneas a partir do mosto extraído de cada uma das 66 amostras. Para cada vinha, preparou-se adicionalmente uma amostra composta, obtida pela mistura de volumes iguais de mosto de cada ponto de amostragem, perfazendo 77 amostras. Da totalidade das amostras, apenas 50 (64,9%) realizaram fermentações espontâneas até à perda de peso de 70 g/L. Como se verifica na Tabela IV-1, apenas em duas vinhas as sete amostras fermentaram na totalidade, uma localizada no Dão (7) e outra localizada na região dos Vinhos Verdes (11). Por outro lado, foi também na região dos Vinhos Verdes (localizações 9 e 10), que se observou o menor número de amostras capazes de fermentar. Por cada fermentação concluída obtiveram-se 30 isolados de levedura, o que fez 1500 isolados no total. A análise das sequências interdelta permitiu diferenciar 64 estirpes de *S. cerevisiae*.

Todos os isolados apresentaram o padrão de amplificação característico desta espécie no intervalo de 400-500 bp (Schuller et al., 2004). Na Figura IV-2 apresentam-se alguns exemplos dos perfis dos produtos de amplificação das sequências interdelta obtidos pela eletroforese em gel de agarose.

Analisando o número de estirpes de *S. cerevisiae* diferenciadas em cada região (Tabela IV-1), e tendo em conta o número de isolados a partir dos quais foram obtidas, verifica-se que foi na região do Dão que se observou maior diversidade, contrariamente às regiões do Alentejo e Vinhos Verdes.

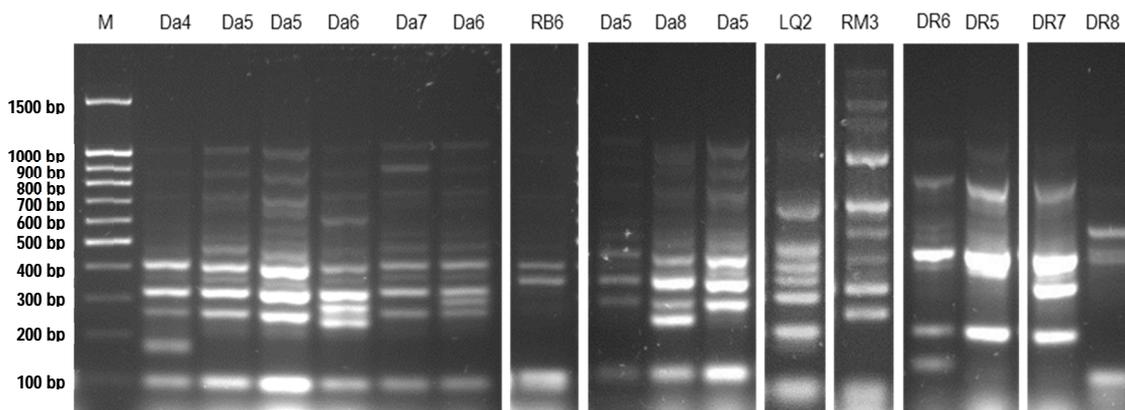


Figura IV- 2: Exemplos de perfis da amplificação de sequências interdelta dos isolados de levedura recolhidos no final das fermentações espontâneas.

A Figura IV-3 apresenta os perfis das fermentações espontâneas correspondentes às amostras das 11 vinhas, assim como as estirpes de *S. cerevisiae* diferenciadas no final de cada uma, e a proporção relativamente ao número de isolados. As amostras que fermentaram até à perda de peso de 70 g/L apresentaram diversos perfis fermentativos. A fase de latência, aqui considerada como o tempo correspondente até à perda de peso de 2 g/L, variou entre os 2 (Dão, 7, e Vinhos Verdes, 11) e os 38 dias (Tejo, 3), embora a maioria das amostras (40) tenha demorado 3 a 8 dias a iniciar a fermentação. Relativamente à duração da fermentação, considerada como o intervalo de tempo entre a perda de peso de 2 g/L e 70 g/L, variou entre os 2 (Porto e Douro, 6) e os 47 dias (Vinhos Verdes, 9), sendo que a maioria das amostras (35) fermentou num intervalo de tempo que variou entre 3 a 12 dias. A duração da fase de latência nem sempre foi proporcional à da fermentação, isto é, foram observadas fermentações rápidas com fases de latência longas e fermentações demoradas com fases de latência curtas, por exemplo Porto e Douro (6) e Vinhos Verdes (10), respetivamente. A duração da fermentação não parece estar relacionada com a diversidade de estirpes observadas no final da fermentação, uma vez que, tanto nas mais lentas como nas mais rápidas, o número de estirpes diferentes variou entre 1 e 4. Como neste estudo não foi efetuada a caracterização das espécies e estirpes ao longo do processo fermentativo, não podemos inferir sobre a possível influência da população microbiana presente no início e a meio da fermentação. Em geral, no final de cada fermentação espontânea, os isolados diferenciados ou pertenciam à mesma estirpe de *S. cerevisiae* ou existia uma estirpe dominante que era acompanhada por outras estirpes em número muito inferior. Apenas as fermentações das amostras 1 e 6 do Dão (7) foram finalizadas por duas e três estirpes predominantes, respetivamente.

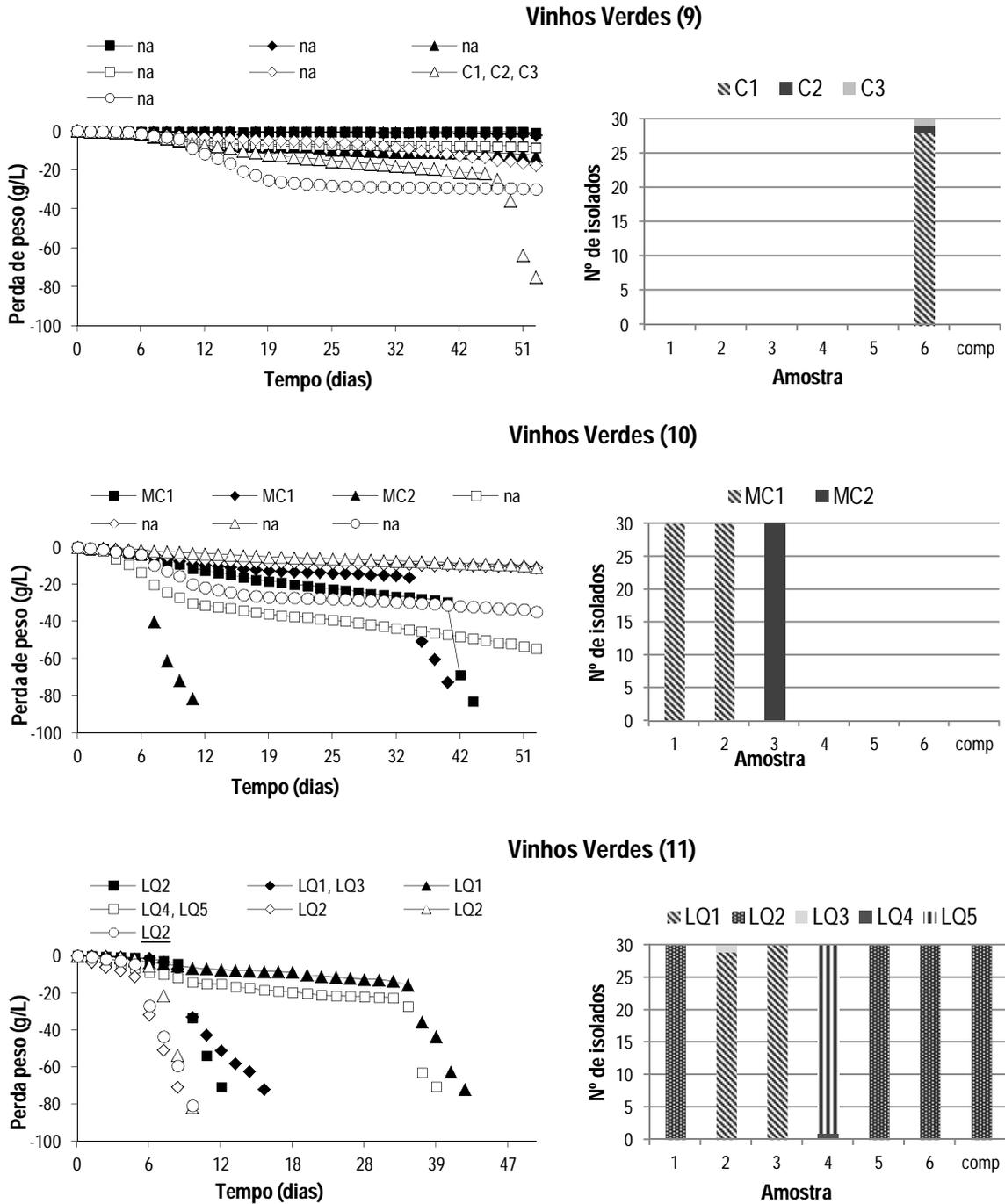


Figura IV- 3: Perfis das fermentações espontâneas (linhas) correspondentes às amostras das 11 vinhas e estirpes de *S. cerevisiae* diferenciadas no final de cada uma (esquerda); e a proporção de cada estirpe relativamente ao número total de isolados (barras) observadas no final de cada fermentação (direita). As vinhas das diferentes regiões estão numeradas de 1 a 11. Para cada vinha são apresentados os resultados relativos a sete amostras, uma composta e seis não compostas. Em cada perfil de fermentação, encontram-se referidas as designações das estirpes de *S. cerevisiae* diferenciadas. As designações sublinhadas correspondem às estirpes identificadas nas amostras compostas e a designação n.a. (não aplicável) corresponde às amostras que não fermentaram.

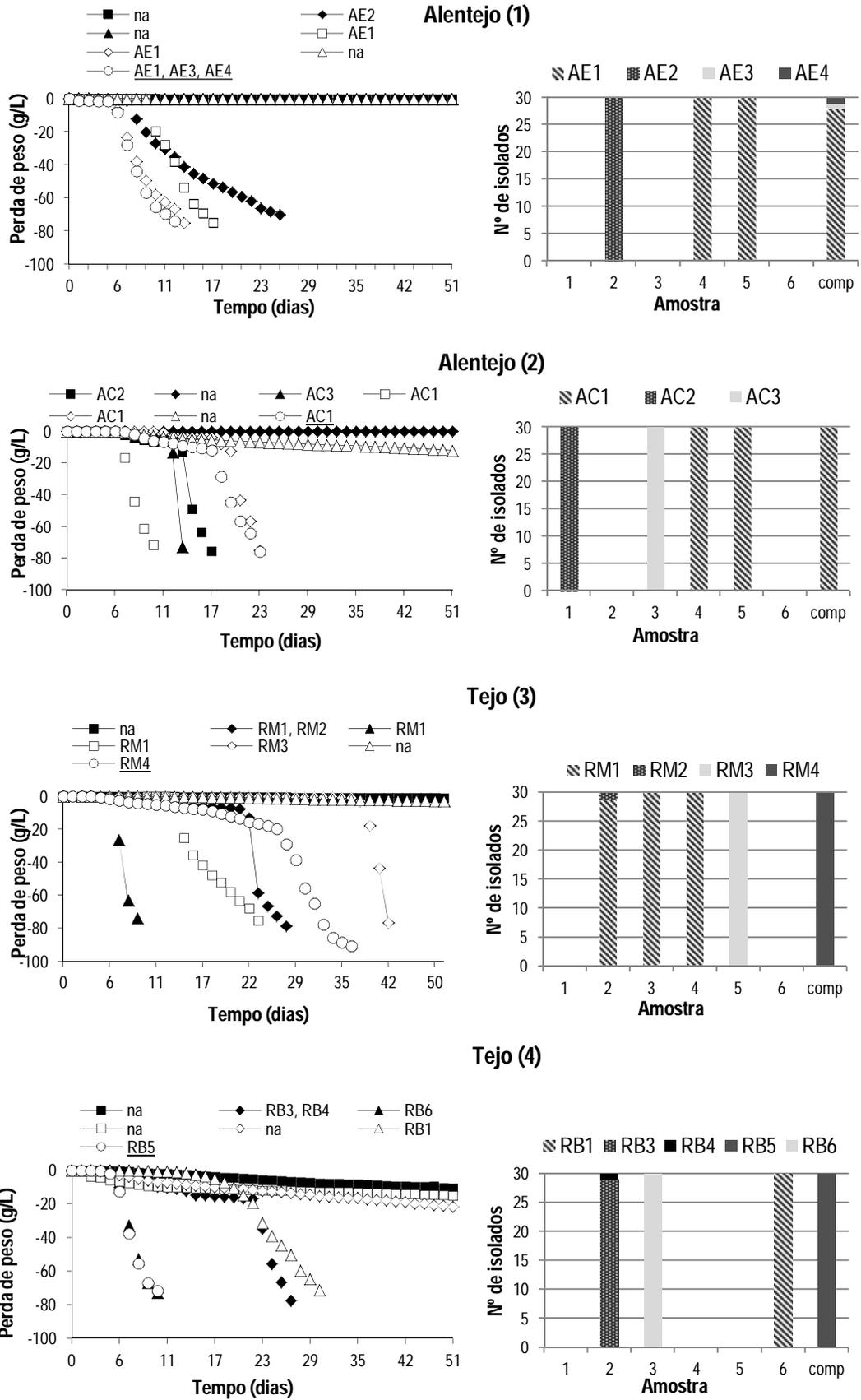
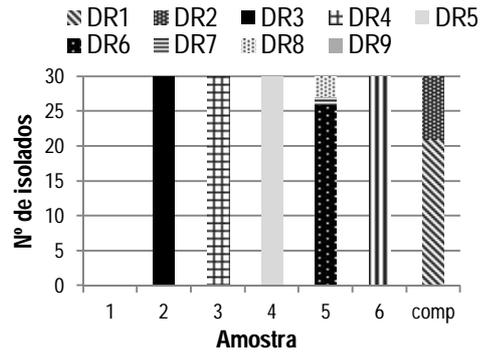
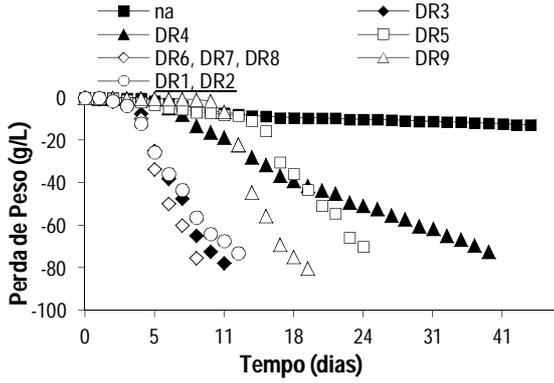
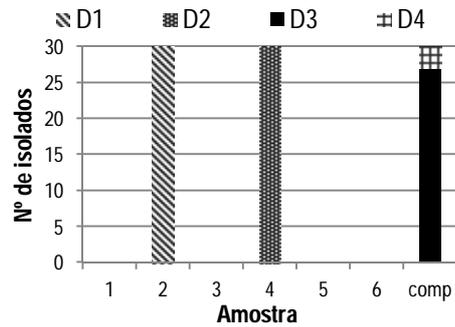
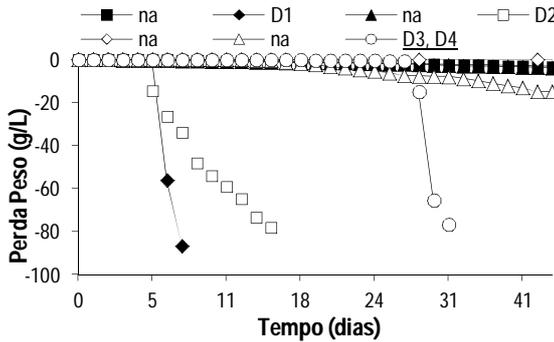


Figura IV-3: Continuação.

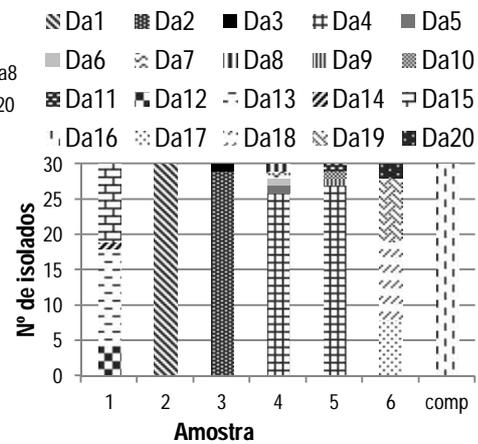
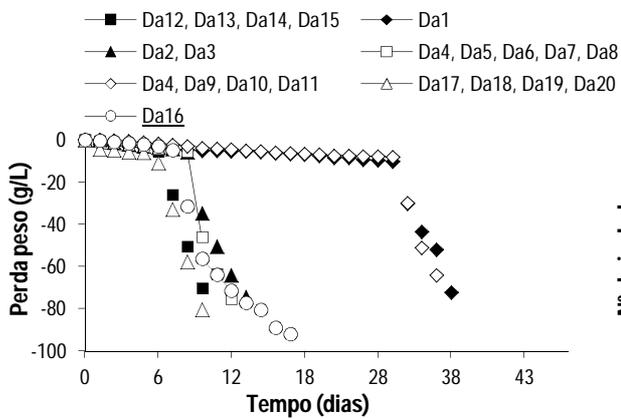
Porto e Douro (5)



Porto e Douro (6)



Dão (7)



Bairrada (8)

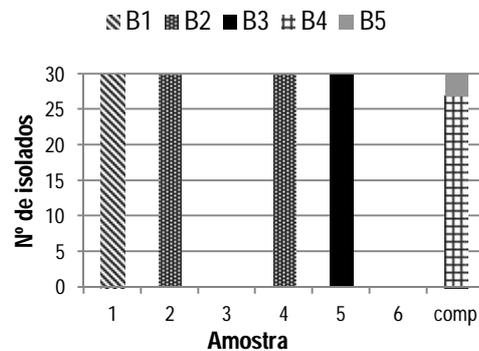
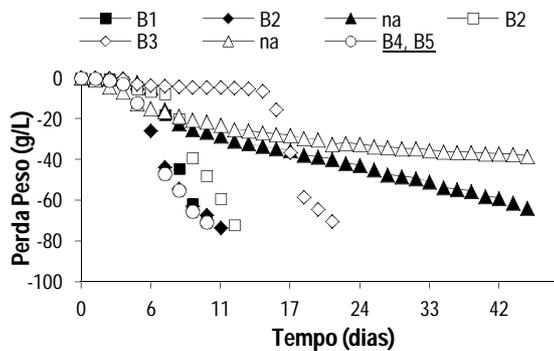


Figura IV-3: Continuação.

Das 64 estirpes de *S. cerevisiae* diferenciadas, 14 foram isoladas a partir das fermentações espontâneas das amostras compostas. Nas vinhas onde se observou uma maior diversidade de estirpes de *S. cerevisiae* (Tejo, 3 e 4, Porto e Douro, 5 e 6, Dão, 7, Bairrada, 8), as isoladas no final da fermentação das amostras compostas foram diferentes das isoladas nas outras amostras da mesma vinha. Contrariamente, nas vinhas onde se observou menor diversidade, as amostras compostas ou não fermentaram (Vinhos Verdes, 9 e 10) ou foram controladas por estirpes comuns a outras amostras da mesma vinha (Alentejo, 1 e 2, e Vinhos Verdes, 11).

As análises de caracterização fenotípica foram realizadas com as 64 estirpes de *S. cerevisiae* diferenciadas. Os resultados da caracterização fenotípica estão resumidos na Figura IV-4. Foram efetuados testes para avaliar o potencial da produção de H₂S, do fenótipo *killer* e da atividade β-glucosidásica (Figura IV-4 A) e à resistência a várias concentrações de etanol (12, 14, 16 e 18%, v/v) e de SO₂ (50, 75 e 100 mg/L) (Figura IV-4 B). A avaliação do potencial da produção de H₂S revelou uma produção intermédia ou baixa para a maioria das estirpes (40 e 20, respetivamente). O potencial da produção de H₂S mais elevado observou-se apenas numa estirpe, e 3 estirpes mostraram ser não produtoras de H₂S. Relativamente ao fenótipo *killer*, observou-se que nenhuma das estirpes testadas foi sensível à toxina produzida pela estirpe de referência CECT 1182 (K) e a maioria das estirpes (63) revelou-se neutra. Apenas uma estirpe inibiu o crescimento da estirpe de referência CECT 1415 (S) e foi classificada como *killer*. A atividade da β-glucosidase foi avaliada e a generalidade das estirpes revelou uma atividade média (32) ou baixa (28). Duas estirpes não apresentaram qualquer atividade e outras duas mostraram uma atividade elevada. Observou-se que maioria das estirpes são tolerantes a 12% e 14% (v/v) de etanol (61 e 58, respetivamente), três são tolerantes a 16% (v/v) e nenhuma conseguiu crescer a 18% (v/v). Relativamente à resistência ao SO₂, a generalidade das estirpes (59) conseguiu crescer com a maior concentração testada (100 mg/L), e 63 estirpes cresceram nas concentrações de 50 e 75 mg/L.

As microfermentações efetuaram-se a 18 °C e 70 rpm, com as 64 estirpes autóctones de *S. cerevisiae* e uma estirpe comercial de referência (Lalvin QA23®), em 100 mL de mosto constituído pela mistura de partes iguais das castas *Loureiro* e *Avesso*. No entanto, das 64 estirpes apenas 49 iniciaram a fermentação, e destas 10 correspondem a estirpes isoladas a partir das amostras compostas. Isto significa que 71% das estirpes obtidas a partir de amostras compostas iniciaram as microfermentações.

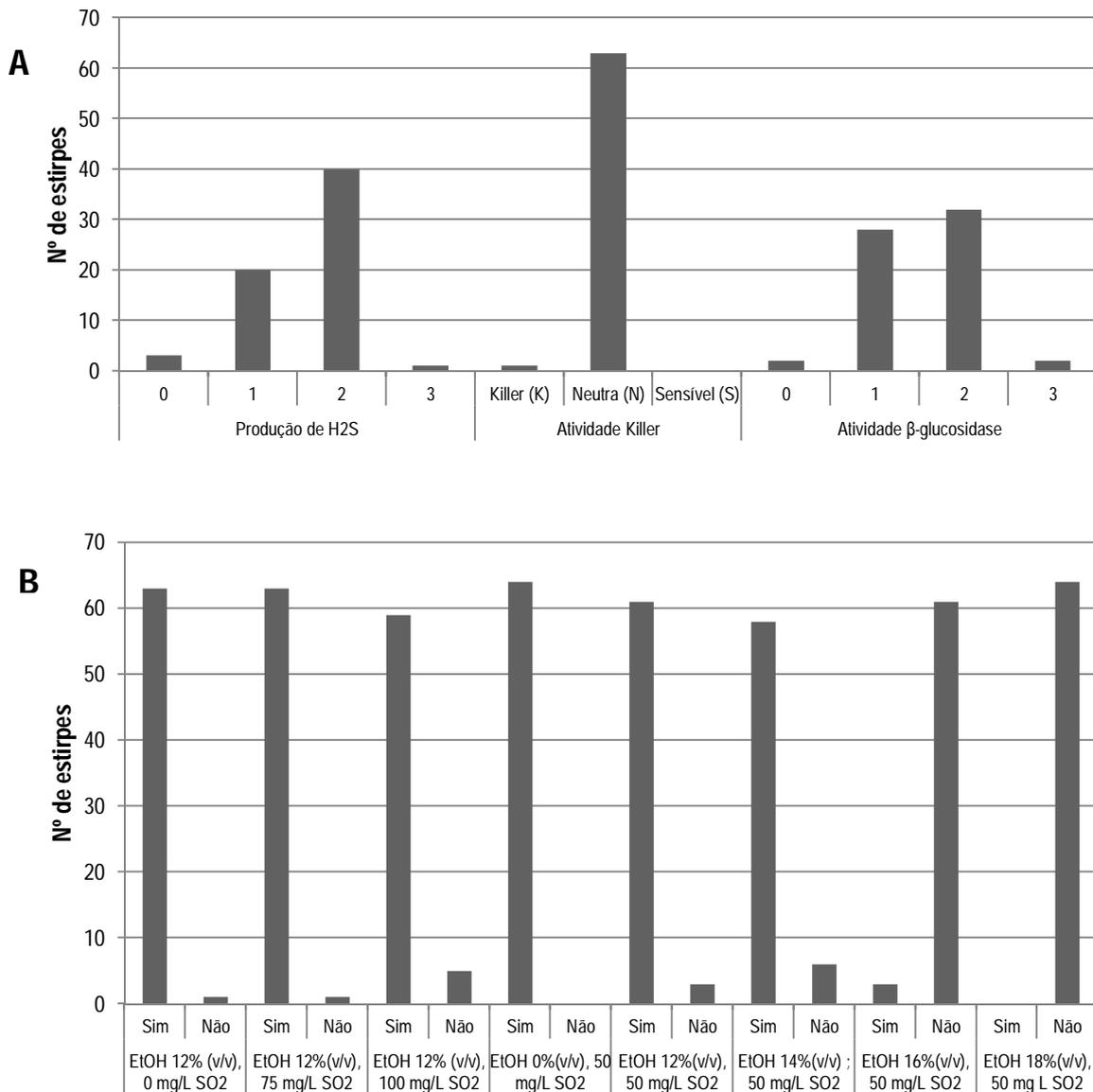


Figura IV-4: Resultados dos testes fenotípicos, representados como número de estirpes que são produtoras de H₂S, que têm atividade β-glicosidásica e fenótipo *killer* (A), e são resistentes a diferentes concentrações de etanol e SO₂ (B). As classificações qualitativas utilizadas nos testes de produção de H₂S e atividade β-glicosidase foram: sem produção/atividade, 0; baixa produção/atividade, 1; produção/atividade intermédia, 2, e produção/atividade elevada, 3, respetivamente.

A Figura IV-5 resume a duração da fermentação das 49 estirpes (assim como o da estirpe de referência) e a prova organolética dos vinhos obtidos (A), e apresenta também os resultados dos testes fenotípicos obtidos para cada uma destas estirpes (B).

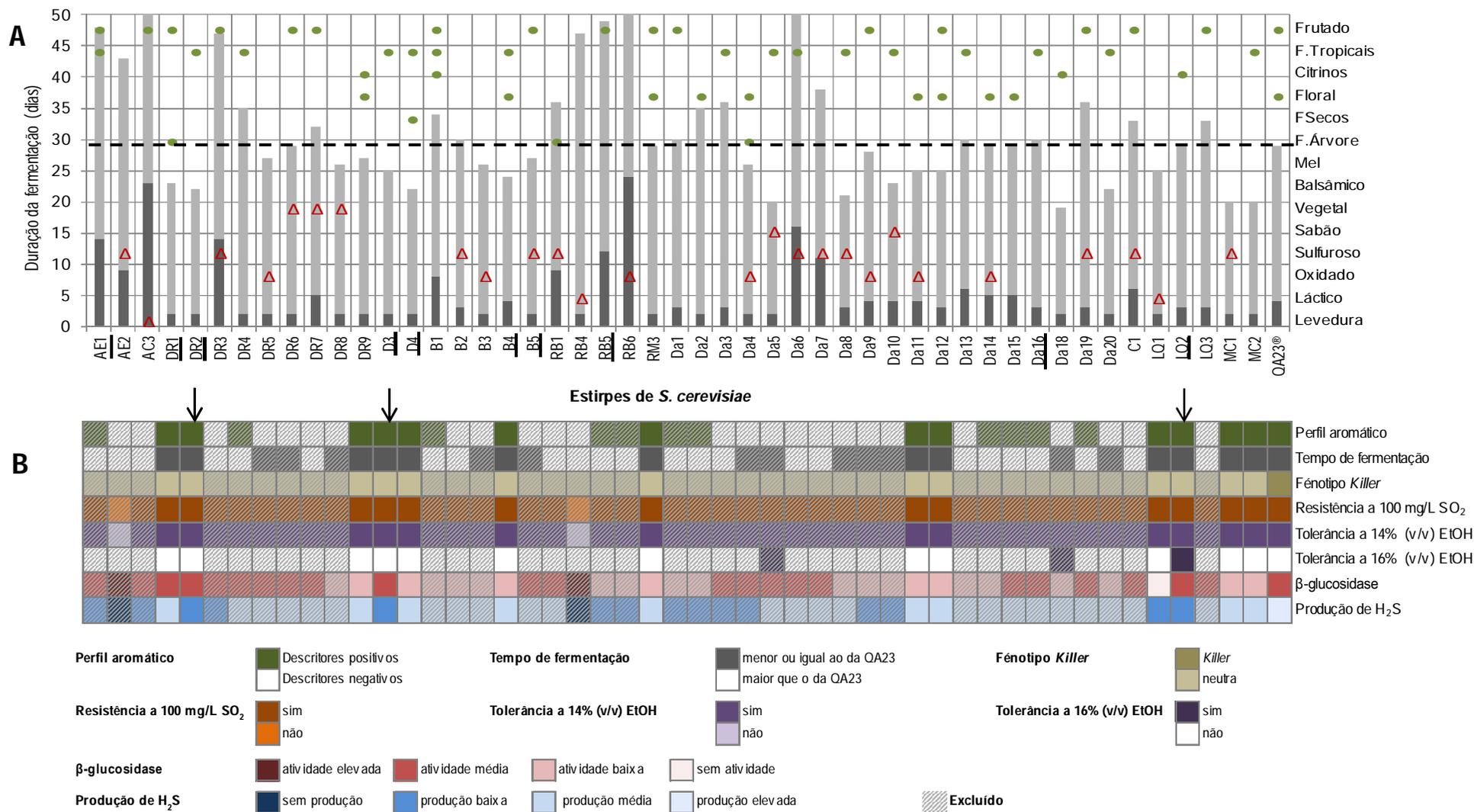


Figura IV- 5: Resumo da duração das microfermentações das 49 estirpes de *S. cerevisiae* que iniciaram a fermentação (assim como a da estirpe de referência Lalvin QA23[®]) e da prova organoléptica dos vinhos obtidos (A), e as características enológicas dessas estirpes (B). (A) Cada barra corresponde à duração da fermentação realizada por cada estirpe, sendo a parte mais escura referente à fase de latência e a mais clara à de fermentação. As estirpes a sublinhado correspondem às isoladas a partir de amostras compostas. A linha horizontal a tracejado indica a duração de fermentação realizada pela estirpe de referência. Os aromas identificados na prova organoléptica estão indicados no eixo vertical secundário, e os detetados em cada vinho encontram-se assinalados em cima da barra correspondente (●- descritor positivo; △- descritor negativo). (B) Os critérios enológicos estão sumariados numa representação esquemática em que cada linha corresponde a um fenótipo e cada coluna a uma estirpe (coincidente com a indicada no eixo do gráfico). Cada quadrado tem uma cor cujo significado se encontra apresentado na legenda. As estirpes excluídas no processo de avaliação da duração da fermentação e prova organoléptica foram marcadas com um padrão de riscas diagonais. As estirpes selecionadas, após avaliação dos restantes testes fenotípicos, foram assinaladas com uma seta (↓).

No gráfico da Figura IV-5 (A) cada barra corresponde à duração da fermentação realizada por cada estirpe, em que a parte mais escura corresponde à fase de latência (número de dias até atingir uma perda de peso de 2 g/L) e a parte mais clara corresponde à duração da fermentação (número de dias desde a perda de 2 g/L até peso constante). Consideraram-se positivas as durações de fermentação iguais ou inferiores à da estirpe de referência, o que foi alcançado por 42% das estirpes, e negativos as restantes. Relativamente ao perfil aromático dos vinhos obtidos, efetuou-se uma simplificação dos resultados, indicando apenas descritores positivos (nos casos em que se revelaram apenas aromas positivos), e descritores negativos (no casos em que se detetou pelo menos um aroma negativo). Aproximadamente um terço (38%) dos vinhos obtidos apresentou apenas descritores positivos, sendo assinalados mais frequentemente o aroma frutado, floral, de frutos tropicais e de citrinos, que são característicos dos vinhos obtidos com estas castas. Foi efetuada uma primeira seleção das estirpes, escolhendo apenas aquelas que tiveram apreciação positiva no perfil aromático e na duração da fermentação, reduzindo para 13 o número de estirpes. Destas, seis foram isoladas das amostras compostas.

As características enológicas foram resumidas numa representação esquemática (Figura IV-5 B), em que cada linha corresponde a uma característica e cada coluna a uma estirpe, que coincide com a indicada no eixo do gráfico (Figura IV-5A). Na interseção do fenótipo com a estirpe encontra-se um quadrado, cuja cor tem um significado que se encontra descrito na legenda. As cores utilizadas variam entre tons mais claros e mais escuros, sendo que a cor escura representa um resultado positivo de uma estirpe em relação a uma característica desejada. As estirpes selecionadas na etapa anterior foram consideradas para nova avaliação tendo como critério os testes fenotípicos. As excluídas da seleção foram marcadas no esquema (Figura IV-5 B) com um padrão de riscas diagonais. As características enológicas consideradas para a seleção das estirpes foram a resistência ao SO₂, tolerância ao etanol e o fenómeno *killer*, que têm impacto na tecnologia da fermentação, e a produção de H₂S e atividade β-glucosidásica, que podem influenciar as propriedades organoléticas dos vinhos produzidos. É importante selecionar estirpes com resistência ao SO₂, uma vez que este composto é regularmente utilizado no processo produtivo, nomeadamente no início da fermentação, para prevenir oxidações e a proliferação de microrganismos indesejáveis. Com o desenrolar da fermentação a concentração de etanol aumenta e é indispensável que a estirpe não seja inibida por esse fator, por isso devem-se selecionar estirpes tolerantes a elevadas quantidades de etanol. Como referido anteriormente (Figura IV-4 B), a maioria das estirpes é resistente às

concentrações de 50 e 75 mg/L de SO₂ e de 12% (v/v) de etanol e nenhuma tolera a concentração de 18% (v/v) de etanol. Assim, neste esquema (Figura IV-5B) não foram consideradas estas concentrações. É importante selecionar estirpes resistentes à toxina produzida pelas estirpes com fenótipo *killer*, pois se inocularmos as fermentações com uma estirpe sensível, existe a possibilidade da fermentação parar ou falhar a implantação da estirpe devido ao efeito *killer* das estirpes indígenas. Como mencionado anteriormente (Figura IV-4 A), nenhuma das estirpes se mostrou sensível à toxina, razão pela qual neste esquema apenas se tenha distinguido as K das N, conforme a legenda da Figura IV-5 (B). As estirpes com elevado potencial para produzir H₂S podem, em certas circunstâncias, como por exemplo concentração de azoto diminuta, produzir quantidades de H₂S que imprimem odor a “ovos podres”. Na seleção de estirpes, é desejável escolher aquelas em que o potencial de produção deste composto seja o mais baixo possível. A atividade da β-glucosidase pode melhorar o perfil organolético, uma vez que quanto maior for a atividade desta enzima maior é a probabilidade do vinho beneficiar da sua ação na libertação de compostos aromáticos como os terpenos. Neste contexto, a seleção das estirpes foi realizada com os seguintes critérios: resistência à concentração de 100 mg/L de SO₂, tolerância igual ou superior a 14% (v/v) de etanol, fenótipo N ou K, baixa produção de H₂S e atividade β-glucosidásica média ou elevada. As três melhores estirpes que satisfaziam estes critérios estão assinaladas na Figura IV-5 (B), com uma seta (↓). As três estirpes de *S. cerevisiae* escolhidas foram todas isoladas a partir das amostras compostas.

Analisaram-se os compostos químicos (frutose, glucose, etanol, glicerol e ácido acético) dos vinhos produzidos com as três estirpes selecionadas anteriormente (DR2, D3 e LQ2) e com a estirpe de referência (Figura IV-6). Em todos, verificou-se o consumo total de glucose e a concentração da frutose foi inferior a 1,2 g/L. A produção de ácido acético não excedeu 0,6 g/L. Relativamente à concentração de etanol, os vinhos produzidos com as três estirpes selecionadas apresentaram concentração superior à obtida com a estirpe de referência, sendo que a estirpe D3 produziu o vinho com o teor de etanol mais elevado (13,6%, v/v). No que respeita à concentração de glicerol, o valor mais elevado foi alcançado com a estirpe D3 (6,4 g/L) tendo sido superior à concentração observada com a estirpe de referência (5,4 g/L).

De seguida, pela avaliação dos resultados da análise dos compostos químicos dos vinhos obtidos com as estirpes DR2, D3 e LQ2 (Figura IV-6), da duração da fermentação e da prova organolética (Figura IV-5), verificou-se que a estirpe D3 teve um bom rendimento na produção de etanol, produziu uma concentração de glicerol consideravelmente superior às restantes estirpes, a fermentação foi mais rápida do que a que utilizou a levedura comercial e a

prova organoléptica revelou um intenso aroma a frutos tropicais. Um vez que a estirpe D3 demonstrou ter um melhor potencial, foi selecionada para utilizar em futuros testes à escala industrial.

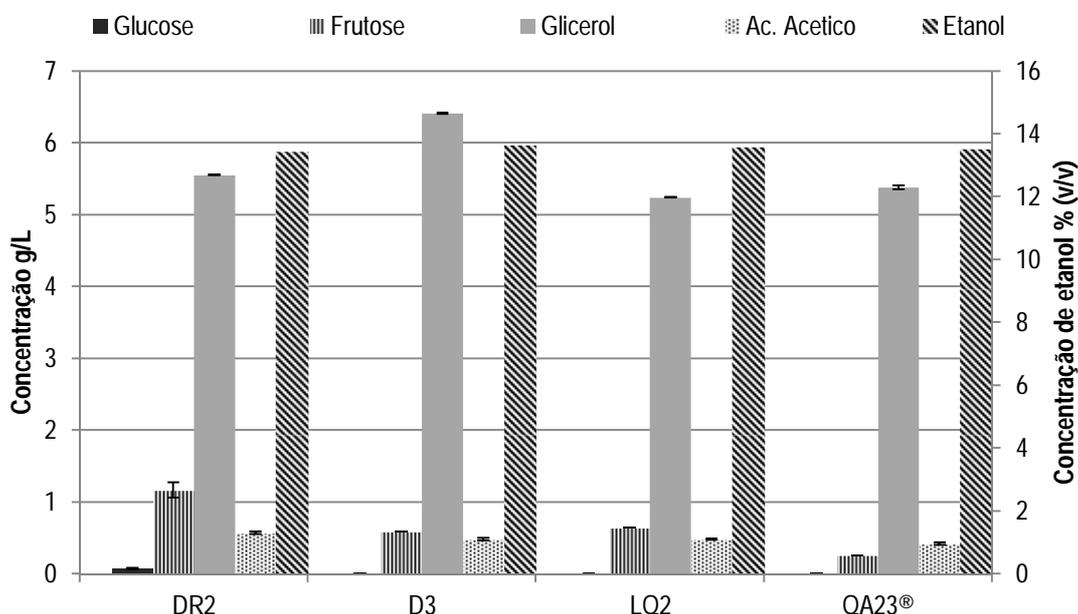


Figura IV-6: Concentrações dos compostos químicos (etanol, glicerol, frutose, glucose e ácido acético) dos vinhos produzidos a partir de mosto da mistura de *Loureiro* e *Avesso* com as estirpes DR2, D3 e LQ2 e com a estirpe de referência (Lalvin QA23®).

4 DISCUSSÃO

Os estudos ecológicos em ambientes vitivinícolas são importantes para a avaliação e preservação da biodiversidade e essenciais para a seleção de estirpes com qualidades enológicas diferentes (Fleet, 2008). As uvas são sempre uma potencial fonte de novas estirpes de leveduras vínicas, por isso a seleção inicia-se geralmente com o isolamento de culturas do mosto resultante do esmagamento das uvas e/ou do vinho obtido pela fermentação espontânea (Pulvirenti et al., 2009).

Neste trabalho obtiveram-se 64 estirpes de *S. cerevisiae* a partir de isolados recolhidos no final de fermentações espontâneas realizadas com mostos provenientes de 11 vinhas. A maior diversidade de estirpes *S. cerevisiae* verificou-se na vinha da região do Dão e a menor nas vinhas do Alentejo e dos Vinhos Verdes. Embora esteja descrita uma possível correlação entre a diversidade de estirpes e o número de fermentações espontâneas de onde foram isoladas (Schuller et al., 2012), os nossos resultados não são conclusivos relativamente a esta hipótese. Nas duas vinhas onde se observou 100% de fermentações espontâneas, numa verificou-se a

maior diversidade (Figura IV-3, Dão-7), o que vai de encontro ao previamente observado (Schuller et al., 2012), mas na outra verificou-se o oposto (Figura IV-3, Vinhos Verdes-11), ou seja, a menor diversidade de estirpes *S. cerevisiae*. Foi demonstrado que mostos com elevada concentração de açúcar e baixo valor de acidez total favorecem a diversidade de estirpes de *Saccharomyces* (Blanco et al., 2012). Esta pode ser uma das razões para justificar a menor diversidade de estirpes na região dos Vinhos Verdes observada neste estudo, uma vez os mostos desta região têm geralmente valores de concentração de açúcar mais baixos e de acidez total superior à das outras regiões. No entanto, os mostos da região do Alentejo apresentam geralmente concentrações de açúcar elevadas e baixos valores de acidez total, pelo que a composição destes não parece ser uma justificação para a baixa diversidade de estirpes observada neste trabalho. Além do mais, outros estudos reportam uma grande diversidade de estirpes na região dos Vinhos Verdes (Schuller et al., 2005), e sendo que as características dos mostos desta região relativamente às dos mostos das outras regiões se mantêm, existiram certamente outras condições que influenciaram a diversidade. Na verdade, estão descritos diversos fatores que influenciam a ocorrência e a sobrevivência de diferentes estirpes nas vinhas, tais como as condições climáticas (Longo et al., 1991; Valero et al., 2007), as práticas de viticultura (Cadez et al., 2010; Cordero-Bueso et al., 2011) e a diversidade de castas de uvas plantadas na vinha (Schuller et al., 2012). O estudo aqui reportado refere-se apenas a um pequeno número amostras de uvas, obtidas apenas num ano e em locais muito diversos, sujeitas a muitas variáveis desconhecidas neste ensaio, pelo a diversidade populacional observada pode estar relacionada com muitas outras causas.

As características genómicas e fenotípicas das populações que iniciam a fermentação, os seus números relativos e os constrangimentos seletivos durante o processo fermentativo, influenciam o desenvolvimento da diversidade da população, determinando se a fermentação é dominada por uma só estirpe ou se existe uma mudança progressiva de génotipos dominantes (Bisson, 2012). Neste estudo verificou-se que a grande maioria das fermentações espontâneas foi concluída por uma estirpe dominante, que por vezes foi acompanhada por outras estirpes em número muito inferior. Este comportamento já foi relatado em investigações anteriores (Cappello et al., 2004; González et al., 2007; Ortiz et al., 2013; Versavaud et al., 1995), e resulta provavelmente da competição entre as estirpes pelos nutrientes, nas condições seletivas do meio. Como já foi referido anteriormente, não foi efetuada a caracterização das espécies e estirpes no início e a meio da fermentação, pelo que não podemos inferir acerca da sua influência para a diversidade observada no final das fermentações. O número de estirpes de *S.*

cerevisiae presentes no final das fermentações não parece estar relacionado com a duração da fermentação, uma vez que se observaram números semelhantes tanto nas fermentações mais rápidas como nas mais lentas.

A preparação de amostras compostas (constituídas por volumes iguais de mostos obtidos a partir de uvas provenientes de diferentes locais da mesma vinha) teve como objetivo obter um mosto análogo ao que seria utilizado numa fermentação espontânea na adega, ou seja, com composição química e diversidade microbiológica mais representativas daquela vinha. Desta forma, foi possível comparar as estirpes que dominaram e concluíram as fermentações nos diferentes tipos de amostras. Das 64 estirpes de *S. cerevisiae* diferenciadas, 14 foram isoladas a partir das fermentações espontâneas das amostras compostas. Nas vinhas onde se observou uma maior diversidade de estirpes de *S. cerevisiae* (Tejo, 3 e 4, Porto e Douro, 5 e 6, Dão, 7, Bairrada, 8), as que concluíram as fermentações das amostras compostas foram distintas das isoladas nas outras amostras da mesma vinha. Contrariamente, nas vinhas onde se observou a menor diversidade, as amostras compostas ou foram dominadas por estirpes comuns às amostras parciais da mesma vinha (Alentejo, 1 e 2, e Vinhos Verdes, 11), ou não fermentaram (Vinhos Verdes, 9 e 10). Estes resultados sugerem que i) a diversidade observada nas amostras compostas pode estar subestimada, ii) os condicionalismos das fermentações em separado podem ser ligeiramente diferentes dos da fermentação composta, possibilitando o domínio da fermentação por outra estirpe; e iii) sendo maior a diversidade inicial das estirpes nas amostras compostas, a competitividade e compatibilidade entre elas pode ter originado o predomínio de outras estirpes.

O processo de seleção de leveduras para aplicação industrial pode ser complexo e exaustivo. Têm sido desenvolvidos alguns trabalhos com o intuito de acelerar e simplificar o processo, seja pela diminuição do número de leveduras a selecionar (Pulvirenti et al., 2009), pelo número de características enológicas a testar (Regodon et al., 1997), ou ambos (Capece et al., 2011). A abordagem do presente trabalho pretendeu reduzir do número de estirpes no processo de seleção (e consequentemente o número de testes realizados), garantindo que as estirpes envolvidas possuem características enológicas apropriadas. Por um lado, comparou-se o comportamento enológico de estirpes isoladas a partir de dois tipos de amostra (compostas e não compostas) e por outro, avaliou-se o desempenho das estirpes relativamente a alguns critérios enológicos considerados importantes do ponto de vista tecnológico e de qualidade do produto (duração da fermentação, perfil organolético, resistência ao SO₂, tolerância ao etanol,

fenómeno *killer*, potencial de produção de H₂S, atividade da β-glucosidase, e concentrações de etanol, glicerol, glucose, frutose e ácido acético no final da fermentação).

Os testes para caracterização enológica compreenderam análises fenotípicas e microfermentações das 64 estirpes de *S. cerevisiae* diferenciadas. Os parâmetros fenotípicos analisados foram a resistência ao SO₂, a tolerância ao etanol e o fenómeno *killer*, que têm impacto na tecnologia da fermentação, e a produção de H₂S e a atividade β-glucosidásica, que podem influenciar as propriedades organoléticas dos vinhos produzidos.

É desejável que as estirpes consigam crescer a concentrações superiores 50 mg/L de SO₂ (OIV, 2012), uma vez que é uma prática comum a adição deste composto no início da fermentação, para prevenir oxidações e a proliferação de microrganismos indesejáveis. A maioria das estirpes analisadas (92%) conseguiu crescer com a maior concentração testada (100 mg/L), resultado que é consistente com outros estudos (Capece et al., 2012; Fiore et al., 2005; Ortiz et al., 2013).

A tolerância das estirpes a concentrações elevadas de etanol é crucial para a sua utilização nos processos fermentativos, uma vez que assegura a completa conversão dos açúcares. Verificou-se que 90% das estirpes tolera 14% (v/v) de etanol, mas apenas 0,5% consegue crescer a concentrações de 16% (v/v). Embora alguns estudos reportem valores de tolerância ao etanol superiores aos obtidos neste trabalho (Capece et al., 2012, 2010b), este resultado reflete o teor alcoólico dos vinhos portugueses que na sua maioria têm um valor máximo de 14% (v/v), salvo algumas exceções que podem atingir os 15% (v/v). De referir que durante a implementação dos testes de resistência ao etanol e SO₂ se verificou ser muito importante realizar os testes imediatamente após a preparação dos meios de cultura, assim como selar as placas de Petri com *parafilm*, de modo a evitar perdas gasosas destes compostos com a consequente diminuição da concentração, que podem originar falsos positivos às concentrações testadas.

O interesse enológico pelas leveduras *killer* prende-se com a sua potencial capacidade de dominar a fermentação e, se possuírem características enológicas positivas, poderem produzir vinhos com boa qualidade num processo fermentativo “protegido” da influência de leveduras da mesma espécie ou espécies relacionadas (Maqueda et al., 2012; Zagorc et al., 2001). Esta proteção deve-se à produção de toxinas de origem proteica, letais para as estirpes sensíveis a essa toxina. Estão descritos quatro tipos de toxinas (K1, K2, K28 e Klus) produzidas por estirpes *killer* de *S. cerevisiae*, mas as que se encontram mais frequentemente nos

ambientes vitivinícolas são leveduras que produzem a toxina K2, pois esta toxina está ativa no intervalo de pH de 2,8-4,8, ou seja, numa gama que inclui os habituais valores de pH do mosto (Maqueda et al., 2012; Ribéreau-Gayon et al., 2006). Existe no entanto alguma controvérsia sobre a utilização de leveduras *killer* para inóculo de fermentações porque não permitem que algumas leveduras presentes no início possam contribuir para o aroma final do vinho (Nikolaou et al., 2006; Ortiz et al., 2013). O critério de resistência à toxina K2, fenótipo *killer* ou neutro (produtora ou não produtora da toxina), deve ser incluído no processo de seleção de estirpes (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Neste trabalho, no que diz respeito ao fenómeno *killer*, nenhuma das estirpes se mostrou sensível à toxina produzida pela estirpe de referência CECT 1182, 63 revelaram-se neutras e apenas uma foi classificada como *killer*. Este resultado é semelhante ao descrito noutros estudos, que também observaram maior número de estirpes classificadas como neutras e menor número estirpes classificadas como *killer* (Ortiz et al., 2013; Regodon et al., 1997).

O metabolismo do enxofre conduz à produção de muitos compostos voláteis com impacto organolético negativo. O H₂S, que confere um odor a “ovos podres”, é um dos mais importantes (Suárez-Lepe and Morata, 2011). A atividade máxima da enzima sulfito redutase de cada estirpe foi determinada pela intensidade da cor resultante da combinação do bismuto (indicador presente no meio de cultura) com os sulfuretos obtidos pela redução dos sulfitos. A seleção de leveduras com uma baixa tendência para produzir derivados de enxofre pode minimizar a produção de maus aromas (Nikolaou et al., 2006; OIV, 2012; Suárez-Lepe and Morata, 2011). Todavia, o facto de uma estirpe possuir uma elevada atividade da enzima sulfito redutase não significa que produza H₂S em excesso nos meios completos, porque este teste avalia o potencial da produção de H₂S em condições de depleção de nutrientes, nomeadamente de azoto (Jiranek et al., 1995). A maioria das estirpes avaliadas neste trabalho possui uma produção intermédia ou baixa (63% ou 31% das estirpes, respetivamente), pelo que devem seleccionar-se as estirpes com baixo potencial de produção ou, no caso de se optar por estirpes com potencial intermédio de produção de H₂S, deve-se adicionar nutrientes ao mosto.

A composição química geral da maioria das castas de uvas é muito semelhante, mas há claras diferenças de aroma e sabor entre elas, que se devem sobretudo a variações relativamente pequenas nas proporções dos compostos que constituem o perfil aromático da uva (Styger et al., 2011). Destes compostos, os mais importantes são os monoterpenos como o linalol, o geraniol e o nerol (que conferem aromas florais e cítricos), que podem estar presentes nas uvas na forma livre, mas a maioria encontra-se na forma de glicoconjugados não voláteis

(Gamero et al., 2011; Styger et al., 2011). Durante a fermentação os precursores glicosídicos são hidrolisados pela ação de glicosidases, nomeadamente a β -glucosidase, e os compostos aromáticos são libertados no vinho (Bisson and Karpel, 2010; Gamero et al., 2011; Styger et al., 2011). Por esta razão, a seleção de estirpes com atividade β -glucosidásica superior à normal, pode melhorar o perfil organolético através do aumento da libertação de compostos aromáticos. No entanto, deve-se ter em conta que quando fermentamos mostos de castas tintas a atividade desta enzima pode afetar negativamente a cor. A avaliação qualitativa da atividade da β -glucosidase das estirpes isoladas neste trabalho revelou que a maioria tem uma atividade média (55%) ou baixa (40%), pelo que na seleção optamos pelas que revelaram ter uma atividade média.

A realização das microfermentações no mosto para o qual se pretende selecionar as leveduras tem duas vantagens: observar as características enológicas das leveduras nas condições específicas do mosto, como a duração da fermentação e a composição química do vinho; e perceber o perfil organolético que a levedura imprime ao vinho.

Este trabalho envolveu a seleção de uma levedura para aplicar num mosto constituído por uma mistura das castas *Loureiro* e *Avesso* da região do Vinhos Verdes, mas o princípio pode ser aplicado noutras castas de diferentes regiões. Os vinhos produzidos com as castas de uvas brancas da região do Vinhos Verdes tem aromas frutados e em alguns casos distinguem-se notas florais, e a nível gustativo são leves e ligeiramente acídulos (Genisheva, 2007). A maioria dos produtores de Vinho Verde utiliza uma estirpe comercial que foi isolada na região (Lalvin QA23[®], Lallemand) para a produção de vinho com uvas de castas brancas. De acordo com o fabricante, esta levedura produz vinhos frescos, frutados, aumenta os aromas varietais terpénicos através da ação da enzima β -glucosidase e é um excelente conversor de tióis. Esta levedura comercial foi incluída nas microfermentações, e os resultados obtidos foram usados como referência para avaliar o desempenho das outras leveduras, nomeadamente nas características que influenciam a tecnologia da fermentação como é o caso da duração da fermentação. Verificou-se que 26 estirpes fermentaram tão ou mais rapidamente que a levedura comercial.

O perfil sensorial de um vinho é o resultado de um grande número de interações entre os vários compostos químicos presentes, que se combinam de forma sinérgica ou antagonística, na medida em que podem aumentar ou diminuir a perceção sensorial de cada um (Styger et al., 2011). A prova organolética efetuada por provadores treinados possibilita uma avaliação rápida

do perfil sensorial obtido pela conjugação de todos os compostos, que nem sempre é evidente pela análise por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC-MS). A análise sensorial dos vinhos obtidos na microfermentações, realizada por um pequeno painel de provadores treinados, revelou que 25 dos vinhos apresentava apenas descritores de aroma positivos.

A análise dos compostos químicos dos vinhos obtidos permite-nos conhecer mais algumas propriedades das estirpes. O teor de açúcares residuais (glucose e frutose) permite-nos verificar se a estirpe consegue fermentar completamente os açúcares presentes no mosto. Também é importante conhecer a concentração de etanol que as estirpes produzem em resultado da conversão dos açúcares fermentescíveis, uma vez que teores mais elevados transmitem uma maior sensação de calor. A concentração de glicerol tem impacto direto nas características organoléticas na medida em que pode aumentar a densidade e a doçura do vinho. Assim, embora dependa do estilo de vinho, é desejável seleccionar leveduras que produzam elevadas quantidades deste composto (OIV, 2012; Yalcin and Ozbas, 2008). O ácido acético, quando presente em concentrações elevadas, confere um aroma a vinagre, pelo que devem ser seleccionadas estirpes que metabolizem baixas concentrações deste composto (OIV, 2012).

O método de seleção foi orientado segundo uma análise sequencial de vários critérios: duração total da fermentação, perfil organolético, resistência ao SO_2 , tolerância ao etanol, fenómeno *killer*, potencial de produção de H_2S , atividade β -glucosidase, e concentrações de etanol, glicerol, glucose, frutose e ácido acético no final da fermentação. Efetuou-se uma primeira triagem escolhendo estirpes cuja duração da fermentação foi igual ou inferior à da estirpe de referência e que simultaneamente apresentaram apenas descritores aromáticos positivos, que reduziu o número de estirpes em apreciação para 13. Considerados os critérios resistência à concentração de 100 mg/L de SO_2 , tolerância igual ou superior a 14% (v/v) de etanol, fenótipo N ou K, baixa produção de H_2S e atividade β -glucosidásica média ou elevada, restringiu-se para três o número de estirpes em análise. Finalmente, a interseção dos resultados dos compostos químicos (frutose, glucose, etanol, glicerol e ácido acético) com a duração da fermentação e análise organolética, permitiu-nos seleccionar a estirpe D3. Esta estirpe fermentou mais rapidamente que a estirpe usada como referência e apresentou um aroma a frutos tropicais, produziu uma concentração de 6,4 g/L de glicerol e de 13,6% (v/v) de etanol, enquanto os valores observados para a comercial foram de 5,4 g/L e 13,5% (v/v), respetivamente. Esta abordagem permite reduzir os testes de caracterização realizados para seleccionar as leveduras para aplicação industrial, uma vez que os critérios são analisados sequencialmente e apenas

estirpes selecionadas na etapa anterior são submetidas à análise dos critérios enológicos das etapas seguintes.

A comparação do desempenho de estirpes isoladas a partir de dois tipos de amostra (compostas e não compostas) no processo de seleção permitiu-nos avaliar a possibilidade de reduzir o número de estirpes. Das 64 estirpes que se inocularam para a realização de microfermentações, apenas 49 iniciaram a fermentação, e destas, 10 correspondiam a estirpes isoladas a partir de amostras compostas, ou seja, 71% das estirpes isoladas inicialmente a partir deste tipo de amostras. Após a primeira triagem, o conjunto de estirpes foi reduzido para 13 e incluía seis estirpes recolhidas a partir das amostras compostas, ou seja, nesta fase da seleção quase metade (43%) destas estirpes permaneciam como potenciais selecionadas. Após a escolha das três melhores estirpes, verificou-se que todas tinham sido isoladas a partir das amostras compostas, ou seja, das 64 estirpes isoladas neste trabalho, as que chegaram à fase final da seleção foram as obtidas a partir das amostras compostas. Esta observação sugere que, sendo provável que exista inicialmente uma maior diversidade de estirpes nas amostras compostas, as que se conseguem implantar e terminar a fermentação são as que possuem as características tecnológicas mais competitivas. Deste modo, se optarmos por aplicar o processo de seleção apenas às estirpes isoladas nas amostras compostas, reduzimos o número de fermentações espontâneas e de isolados de leveduras, com a consequente diminuição do volume de trabalho e dos custos.

Agradecimentos

Eugénia Vieira beneficiou de uma bolsa de doutoramento (Vinalia e FCT (SFRH / BDE / 33672/2009). Este estudo também foi financiado por fundos nacionais da Fundação para a Ciência e Tecnologia, projecto PTDC/AGR-ALI/103392/2008, e do Sétimo Programa-Quadro da Comunidade Europeia (FP7/2007-2013) sob o contrato n.º 232454 e ainda pelo POFC (Programa Operacional Factores de Competitividade)-COMPETE e fundos da FCT no âmbito do projecto PEst – C/BIA/UI4050/2011.

CAPÍTULO V

**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE UMA LEVEDURA VÍNICA EM
FERMENTAÇÕES À ESCALA PILOTO E INDUSTRIAL**

RESUMO

Neste trabalho foi avaliado o potencial de uma estirpe *Saccharomyces cerevisiae* (D3) para aplicação em vinificações industriais. Esta estirpe foi isolada e selecionada no âmbito do estudo apresentado no capítulo anterior, recorrendo a testes laboratoriais em pequena escala. Como estes testes não reproduzem com exatidão as fermentações à escala industrial, a avaliação enológica das estirpes selecionadas deve incluir também ensaios à escala piloto e industrial. Assim, foram vinificados diferentes mostos de castas de uvas brancas (*Alvarinho*, *Loureiro*, *Batoca*, *Loureiro/Avesso*, *Chardonnay*, *Sauvignon blanc*, *Riesling* e *Gewurztraminer*) e de uvas tintas (*Touriga nacional*, *Cabernet sauvignon*, *Merlot* e *Syrah*) com a estirpe D3. Em três castas de uvas brancas (*Loureiro*, *Batoca* e mistura de *Loureiro* e *Avesso*) foram realizadas fermentações em paralelo com a levedura comercial Lalvin QA23[®]. A implantação das estirpes foi efetiva em todas as fermentações, tanto as realizadas com a levedura D3 como a comercial Lalvin QA23[®]. Os tempos de fermentação com a estirpe D3 variaram entre 7 a 14 dias para as castas de uvas brancas (16, 18-20 °C) e entre 4 e 7 dias para as castas de uvas de tintas (25-28 °C). A concentração de glicerol obtida com a estirpe D3 variou entre 5,8 e 13,11 g/L, valores superiores ao limiar de perceção sensorial no vinho. Todos os vinhos apresentaram concentração de ácido acético inferior ao limite de perceção sensorial (0,7 g/L). Dos 71 compostos voláteis analisados nos três vinhos produzidos, 21% apresentou teores superiores ao limiar de perceção. Destes, destaca-se o éster 9-decenoato de etilo (descriptor de aroma frutado), que apenas apresentou teores superiores ao limiar de perceção nos vinhos produzidos com a estirpe D3. A formação de concentrações significativas deste éster parece ser uma característica metabólica da estirpe selecionada. Nos restantes compostos com impacto no aroma, as diferenças observadas entre os vinhos produzidos foram mais quantitativas do que qualitativas. O vinho da casta *Loureiro* produzido com a estirpe D3 mostrou concentração superior dos três tióis voláteis analisados, 44% (4MMP), 148% (3AMH) e 67% (3MH), comparativamente ao produzido com a comercial. A análise sensorial dos vinhos das castas *Loureiro* e *Avesso* indicou que o vinho produzido com a estirpe D3 tem um aroma frutado mais intenso, tem um sabor mais persistente e que transmite uma maior sensação de calor. Estas características sensoriais são fundamentadas pelos resultados das concentrações de 9-decenoato de etilo, assim como de outros compostos de álcoois superiores, de ésteres e de acetatos, que contribuem para as notas frutadas, e de etanol e de glicerol, que conferem a sensação de calor e corpo do vinho.

1 INTRODUÇÃO

A adição de culturas puras de leveduras selecionadas ao mosto, para realizar a fermentação alcoólica, é uma prática enológica que está atualmente generalizada na indústria de produção de vinho. O sucesso deste procedimento deve-se não só à melhoria da qualidade dos vinhos produzidos, que resulta de um maior controlo da fermentação, mas também à possibilidade de diversificar os estilos de vinhos recorrendo a estirpes com diferentes propriedades enológicas (Chambers et al., 2009b; Lambrechts and Pretorius, 2000; Pretorius, 2000; Rainieri and Pretorius, 2000; Swiegers et al., 2006b).

O mosto é um substrato não estéril que contém uma grande diversidade de microrganismos, em particular leveduras capazes de o fermentar, pelo que as fermentações são ecologicamente complexas, sejam espontâneas ou inoculadas com culturas selecionadas. O inóculo de leveduras, normalmente monoculturas de estirpes de *S. cerevisiae*, precedido da adição de agentes antissépticos como dióxido de enxofre, ao qual a maioria das leveduras não-*Saccharomyces* é pouco resistente, devia garantir o domínio das estirpes inoculadas. No entanto, embora seja expectável que este procedimento suprima as espécies não-*Saccharomyces* e as estirpes *S. cerevisiae* indígenas, ou que pelo menos a(s) estirpe(s) inoculada(s) domine(m) a fermentação, vários estudos têm demonstrado que isso nem sempre acontece (Barrajón et al., 2009; Beltran et al., 2002; Capece et al., 2011, 2010a; Lopes et al., 2007b). Existem várias condições que podem influenciar a diversidade da flora indígena e consequentemente a capacidade de implantação das leveduras inoculadas, como as relacionadas com as práticas vitivinícolas utilizadas, as castas de uvas, as características geográficas, entre outras (Barrajón et al., 2009; Lopes et al., 2007b). O domínio das estirpes inoculadas depende também das condições específicas de vinificação, tais como: a quantidade e viabilidade do inóculo; as características fisiológicas e metabólicas das leveduras selecionadas; e a tecnologia usada na vinificação, nomeadamente procedimentos de clarificação, temperatura de fermentação e adição de SO₂ (Amerine and Cruess, 1960; Benda, 1982; Ciani and Rosini, 1993; Ciani et al., 2010; Reed and Nagodawithana, 1988). Quando se pretende que as leveduras inoculadas confirmem determinadas características ao vinho, é particularmente importante que a levedura selecionada predomine durante a fermentação (Capece et al., 2012). Assim, a capacidade que a levedura tem para dominar as fermentações à escala industrial é uma característica que deve ser avaliada nos programas de seleção de leveduras (Capece et al., 2012).

As leveduras responsáveis pela fermentação, contribuem para o perfil sensorial do vinho através de diferentes mecanismos: pela síntese *de novo* de metabolitos primários (e.g.: etanol, glicerol, ácido acético) e secundários (e.g.: ésteres, álcoois superiores, ácidos gordos), produzindo enzimas que transformam compostos não voláteis precursores de aromas em compostos voláteis (e.g.: monoterpenos, tiós) e modificando constituintes químicos do mosto em compostos com impacto no perfil sensorial como a reação das antocianinas com metabolitos das leveduras que forma pigmentos estáveis (Styger et al., 2011; Ugliano and Henschke, 2009). O etanol é o principal produto da fermentação dos açúcares presentes no mosto, e contribui para a viscosidade e doçura do vinho (Romano et al., 2006). O catabolismo dos açúcares origina compostos não voláteis (os polióis e os ácidos carboxílicos), e outros compostos voláteis como os álcoois superiores, os ésteres, os compostos carbonilados, os ácidos gordos voláteis e os compostos sulfurosos voláteis (Ugliano and Henschke, 2009). Os principais polióis formados durante a fermentação são o glicerol e o 2,3 – butanodiol (Suárez-Lepe and Morata, 2011). O glicerol é produzido sobretudo no início da fermentação (Ribéreau-Gayon, 2006) e embora não tenha impacto direto no aroma, confere um sabor ligeiramente doce e contribui para a suavidade, consistência e corpo do vinho (Lambrechts and Pretorius, 2000; Scanes et al., 1998). O 2,3-butanodiol aumenta a suavidade do vinho, integrando melhor a fração polifenólica (Suárez-Lepe and Morata, 2011). Os ácidos carboxílicos produzidos, como o ácido succínico, em conjunto com os ácidos presentes na uva (ácido tartárico, ácido málico e pequenas concentrações de ácido cítrico), conferem acidez e adstringência aos vinhos, que são características fundamentais para definir a estrutura e equilíbrio de um vinho (Ugliano and Henschke, 2009). Os álcoois superiores acrescentam uma desejável complexidade aromática aos vinhos quando estão presentes em concentrações inferiores a 300 mg/L, mas poderão ter um impacto negativo em concentrações superiores a 400 mg/L (Lambrechts and Pretorius, 2000). Os ésteres produzidos durante a fermentação são responsáveis em grande parte pelo aroma frutado dos vinhos, desempenhando um papel importante no perfil dos vinhos jovens (Lambrechts and Pretorius, 2000). As principais classes de ésteres nos vinhos são os acetatos de álcoois superiores e os ésteres de ácidos gordos. Os compostos mais significativos do grupo de acetatos de álcoois superiores conferem aromas a frutos, a banana, a flores, a mel e a rosas, e os do grupo de ésteres de ácidos gordos atribuem aromas a maçã, a papaia, a morango, a banana e a ananás (Cordente et al., 2012; Oliveira, 2000). Os ácidos gordos voláteis, como por exemplo o ácido acético, contribuem geralmente com odores considerados negativos. Quando presente em concentrações elevadas, o ácido acético confere um aroma a vinagre. No entanto, a concentração dos ácidos gordos voláteis raramente atinge o limiar de perceção, e estes compostos são necessários para um bom

equilíbrio do aroma fermentativo (Oliveira, 2000; Ribéreau-Gayon et al., 2006). Existe um grande número de compostos carbonilados que podem ser formados durante a fermentação, mas a maioria está presente em teores dificilmente detetáveis (Oliveira, 2000). Um dos principais compostos carbonilados suscetíveis de influenciar o aroma é o acetaldeído, que em baixas concentrações confere um aroma frutado mas em concentrações elevadas confere um odor irritante que lembra relva verde ou maçãs (Liu and Pilone, 2000). A maioria dos compostos sulfurosos voláteis está associada a maus aromas contribuindo com odores de ovo podre, de repolho cozido, de cebola e de borracha (Swiegers and Pretorius, 2007; Ugliano and Henschke, 2009). A exceção são os compostos de enxofre polifuncionais de cadeia longa, os tióis voláteis, que são libertados através da ação de enzimas produzidas pela levedura, que em baixas concentrações conferem aromas agradáveis. Os tióis voláteis mais importantes são o 4-mercapto-4-metilpentano-2-ona (4MMP), o 3-mercaptohexano-1-ol (3MH) e o acetato de 3-mercaptohexilo (3AMH), que em concentrações ótimas conferem aromas a buxo, a maracujá, a toranja, a groselha, a goiaba e a litchia (Swiegers et al., 2007), e em excesso podem conferir aromas a urina de gato e a suor (Tominaga and Dubourdieu, 2000). As enzimas produzidas pela levedura catalisam reações, e as mais estudadas são as que envolvem duas importantes classes de compostos não voláteis precursores de aroma, os conjugados glicosídeos e os cisteinilados. Durante a fermentação os precursores glicosídicos são hidrolizados pela ação de glicosidases, nomeadamente a β -glucosidase, e os compostos do aroma são libertados no vinho (Bisson and Karpel, 2010; Gamero et al., 2011; Oliveira, 2000; Styger et al., 2011). Destes compostos os mais importantes são os monoterpenos como o linalol, o geraniol e o nerol (que conferem aromas florais e cítricos), e os C13-norizoprenoides (Gamero et al., 2011; Styger et al., 2011). Os tióis polifuncionais de cadeia longa resultam da clivagem dos conjugados cisteinilados, realizada pela atividade da β -liase de carbono e enxofre (Bisson and Karpel, 2010; Swiegers and Pretorius, 2007). Finalmente, os metabolitos produzidos pelas leveduras podem participar em reações químicas, para gerar novos componentes de aroma ou levar à perda de aromas que derivam de outras origens (Bisson and Karpel, 2010). Além disso, os metabolitos produzidos pela levedura podem agir de uma forma mais complexa, melhorando a percepção dos aromas existentes ou mascarando os componentes ativos do aroma (Bisson and Karpel, 2010; Escudero et al., 2007; Ferreira and Cacho, 2009; Styger et al., 2011).

A obtenção de novas estirpes de leveduras vínicas para aplicação comercial é efetuada essencialmente com base em duas estratégias: o isolamento a partir de origens naturais, como as uvas e as fermentações espontâneas que produziram vinhos de qualidade; e o melhoramento

genético de isolados naturais (Fleet, 2008). O recurso a técnicas de genética clássica ou de DNA recombinante possibilita o desenvolvimento de estirpes com funcionalidades específicas interessantes para aplicação na indústria vitivinícola (Fleet, 2008; Mannazzu, I., Clementi, F. and Ciani, 2002; Schuller and Casal, 2005). Contudo, enquanto as estirpes de leveduras obtidas por técnicas de genética clássica estão disponíveis e podem ser utilizadas na indústria, as restrições legais e a perceção negativa dos consumidores relativamente à utilização de microrganismos geneticamente modificados (MGM) na produção de alimentos e bebidas, resulta na impossibilidade da comercialização destas leveduras num futuro próximo (Borneman et al., 2012; Chambers et al., 2009b; Mannazzu, I., Clementi, F. and Ciani, 2002; Pretorius, 2000). Neste contexto, o isolamento e seleção de leveduras a partir de ambientes naturais continua a ser a abordagem principal para a obtenção de novas estirpes capazes de conferir propriedades sensoriais distintas ao vinho produzido (Mannazzu, I., Clementi, F. and Ciani, 2002).

Num estudo anterior (Capítulo IV), foi realizado o isolamento e diferenciação genética de estirpes *S. cerevisiae* autóctones de seis regiões vitivinícolas portuguesas, e selecionou-se a estirpe D3. A seleção baseou-se na avaliação de algumas características enológicas, que foram determinadas em testes à escala laboratorial. Geralmente, a escolha da escala para a realização de um estudo é efetuada com base num compromisso entre a exequibilidade e a representatividade do ensaio em relação às condições industriais (Casalta et al., 2010a). O desenvolvimento de metodologias de alto débito que recorrem à miniaturização da escala, nomeadamente em formato de microplacas, permitem rastrear um grande número de leveduras, seja para a avaliação dos perfis fenotípicos (Duetz, 2007; Marešová and Sychrová, 2007; Rodríguez-Palero et al., 2013; Tran et al., 2012) ou das cinéticas de fermentação e atividades metabólicas gerais (Liccioli et al., 2011). Com efeito, um estudo realizado com mosto *Chardonnay* demonstrou que as fermentações anaeróbias em microplacas podem ser uma alternativa aos balões Erlenmeyer para alguns parâmetros (taxa máxima de crescimento, de produção de biomassa, e metabolitos como de glicerol e ácido acético), mas utilização deste formato é limitada para outros, tais como, o consumo de açúcares residuais e concentração de etanol (Liccioli et al., 2011). A realização de fermentações em pequena escala é útil para ensaios preliminares, especialmente quando existe um grande número de estirpes em estudo, mas não reproduz com exatidão as fermentações à escala industrial (Cadière et al., 2012). As condições de fermentação em pequena escala tendem a ser pouco controladas, as condições hidrodinâmicas são diferentes das observadas em volumes maiores (Casalta et al., 2010a), não permitem um controlo preciso da oxigenação o que pode originar desvios metabólicos

(Zimmermann et al., 2006), e existem pequenas diferenças na produção de moléculas do aroma (Casalta et al., 2010a; Rossouw et al., 2012b). Assim, a avaliação das propriedades enológicas das leveduras vnicas selecionadas não pode omitir testes à escala piloto ou industrial, que devem ser realizados com mostos de castas específicas e monitorizados através de análises sensoriais do produto de fermentação de forma a evidenciar o efeito das estirpes nas propriedades sensoriais dos vinhos resultantes (Mannazzu, I., Clementi, F. and Ciani, 2002).

O presente estudo pretendeu avaliar o potencial da estirpe D3 para aplicação em vinificações industriais, comparando o seu comportamento fermentativo à escala piloto e industrial com uma levedura comercial de referência (Lalvin QA23[®]), os metabolitos formados e o perfil aromático dos vinhos produzidos. Foi também avaliada a sua capacidade de implantação em diferentes mostos de castas de uvas brancas e tintas e em diferentes condições de vinificação.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ESTIRPES DE LEVEDURAS

As estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas neste estudo foram a D3, selecionada a partir de um conjunto de estirpes autóctones (Capítulo IV), e a comercial Lalvin QA23[®] (Lallemand) usada como referência. As culturas de leveduras foram adicionadas às fermentações sob a forma de “cultura fresca” (não liofilizada). A partir de estirpes armazenadas em glicerol a -80 °C, efetuaram-se pré-inóculos em 50 mL de meio YPD (1% extrato de levedura, p/v; 1% peptona, p/v; e 2% glucose, p/v), que cresceram durante 24 h (30 °C, 200 rpm). Os inóculos foram preparados em volumes de YPD correspondentes a 1% (v/v) dos volumes de fermentação e incubaram-se durante 30 a 48 h (30 °C, 200 rpm) de forma a atingir uma concentração celular de aproximadamente 1×10^8 células/mL, que foi estimada por leitura da densidade ótica ($D.O_{.550 \text{ nm}}$). Desta forma, após a adição dos inóculos aos mostos a fermentar, a concentração celular inicial era aproximadamente de 1×10^6 células/mL. Apenas a fermentação de 1000 L do mosto de *Loureiro* com a levedura Lalvin QA23[®] foi realizada a partir da cultura liofilizada, sendo o processo de reidratação efetuado de acordo com as instruções do fabricante.

2.2 CASTAS E PROCESSAMENTO DAS UVAS

As fermentações foram realizadas em diferentes mostos de oito castas de uvas brancas e quatro castas de uvas tintas (Tabela V-1). O mosto de 2010, composto por numa mistura *Loureiro* e *Avesso* na proporção aproximada de 50/50% (v/v), foi cedido pela Quinta da Lixa já clarificado (48 h a 4 °C) e contendo 30 mg/L SO₂ livre. Foi conservado por congelação até à realização das fermentações, que foram executadas em outubro de 2010 nas instalações do Departamento de Biologia da Universidade do Minho. Em 2011, as uvas foram colhidas manualmente na vinha experimental da EVAG (Estação Vitivinícola Amândio Galhano) e processadas de acordo com o protocolo utilizado na adegas experimental da mesma estação. As castas brancas usadas incluíram variedades recomendadas para a região (*Alvarinho*, *Loureiro* e *Batoca*) e internacionais (*Chardonnay*, *Sauvignon blanc*, *Riesling* e *Gewurztraminer*). Após o desengace, esmagamento e prensagem das uvas, adicionou-se metabifulfito de potássio ao mosto, de modo a obter uma concentração aproximada de 30 mg/L SO₂ livre. Os mostos foram clarificados a 4 °C durante 48 a 72 h, e fermentados de seguida. Relativamente às castas de uvas tintas, utilizou-se a portuguesa *Touriga nacional* e as internacionais *Cabernet sauvignon*, *Merlot* e *Syrah*. Depois do desengace, as uvas foram esmagadas adicionando-se simultaneamente metabisulfito de potássio (40 mg/L SO₂ total), utilizando-se de imediato o mosto e as películas nas fermentações planeadas.

Tabela V-1: Composição do mosto, ano de colheita e condições de fermentação.

Mosto	Ano	Volume fermentação (L)	Levedura inoculada	Temperatura de fermentação (°C)	Açúcar (g/L)
Mistura de <i>Loureiro</i> e <i>Avesso</i>	2010	50	D3	18	226
Mistura de <i>Loureiro</i> e <i>Avesso</i>	2010	50	Lalvin QA23®	18	226
<i>Loureiro</i> ^{a)}	2011	0,1	D3	18	192
<i>Loureiro</i> ^{a)}	2011	5	D3	18	192
<i>Loureiro</i>	2011	50	D3	18	192
<i>Loureiro</i>	2011	500	D3	16	192
<i>Loureiro</i>	2011	1000	Lalvin QA23®	16	192
<i>Alvarinho</i>	2011	50	D3	18	218
<i>Sauvignon blanc</i>	2011	50	D3	18	219
<i>Batoca</i>	2011	5	D3	18	174
<i>Batoca</i>	2011	5	Lalvin QA23®	18	174
<i>Chardonnay</i>	2011	5	D3	18	209
<i>Riesling</i>	2011	5	D3	18	162
<i>Gewurztraminer</i>	2011	5	D3	18	145
<i>Merlot</i>	2011	50	D3	25	238
<i>Cabernet sauvignon</i>	2011	50	D3	25	216
<i>Touriga nacional</i>	2011	50	D3	25	176
<i>Syrah</i>	2011	50	D3	25	193

a) Realizado em triplicado

2.3 CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

As fermentações foram conduzidas em diferentes volumes, conforme descrito na Tabela V-1, utilizando-se garrafões e matrizes de vidro (tapados com rolhas de algodão) para as capacidades de 5 e 0,1 L e cubas de aço inox para os restantes volumes. A temperatura das fermentações realizadas com castas de uvas brancas foi assegurada de duas formas, as cubas de 500 L e 1000 L possuíam um sistema de refrigeração integrado e os matrizes, garrafões e as cubas de 50 L foram colocados em salas climatizadas. Relativamente às fermentações efetuadas com castas de uvas tintas, as cubas foram colocadas numa divisão não climatizada tendo-se registado diariamente a temperatura ambiente que se manteve aproximadamente constante. O progresso das fermentações foi monitorizado pela avaliação diária da densidade, determinada por areometria de acordo com o método OIV-MA-AS2-01B:R2009, à exceção das realizadas num volume de 0,1 L que foram seguidas pela determinação diária da perda de massa. O arejamento das fermentações de castas de uvas brancas foi realizado diariamente até o valor da densidade se encontrar no intervalo de 1040 a 1030. Nesta fase intermédia da fermentação foi efetuada uma clarificação com bentonite. Este procedimento não se aplicou às fermentações realizadas em 0,1 L de mosto. Nas fermentações de castas de uvas tintas o arejamento e homogeneização da massa vínica foi efetuado até ao final da fermentação. Considerou-se que as fermentações tinham terminado quando a densidade atingiu valores iguais ou inferiores a 995 e 1005, para os mostos de castas brancas e tintas, respetivamente, e quando cessou a perda de massa no caso das fermentações em matrizes. Após a conclusão das fermentações de 2010, foi efetuada uma estabilização pelo frio (4 °C) durante um mês, e o vinho foi engarrafado depois da adição de 30 mg/L de SO₂ livre. Em 2011, no final da fermentação adicionou-se 100 mg/ de SO₂ aos vinhos brancos, efetuou-se a trasfega para cubas de inox e garrafões de vidro adequados ao armazenamento, retirou-se todo o oxigénio das cubas (através da injeção de azoto) e deixou-se o vinho a estabilizar durante 4 meses. Relativamente aos vinhos tintos, após a trasfega foi realizada uma colagem com albumina e, depois de uma segunda trasfega, protegeu-se o vinho segundo o procedimento utilizado nos vinhos brancos. Quando se efetuou o engarrafamento dos vinhos de 2011 não se adicionou SO₂, o que mais tarde originou problemas de oxidação e refermentação em garrafa.

2.4 ISOLAMENTO E PERFIS GENÉTICOS DAS ESTIRPES DE *S. CEREVISIAE*

Na fase final de cada fermentação retirou-se uma alíquota que foi diluída e espalhada em meio YPD. Após incubação (48 h, 30 °C), isolaram-se aleatoriamente 20 colónias que foram armazenadas em glicerol (30%, v/v, - 80 °C), em microplacas de 96 poços. A extração de DNA,

dos isolados do final da fermentação e das estirpes D3 e Lalvin QA23[®], foi executada de acordo com o procedimento descrito no Capítulo III (2.3, procedimento para microplacas). A amplificação das sequências interdelta foi realizada de acordo com um método previamente descrito (Schuller et al., 2004). Após a separação por eletroforese (Capítulo IV, 2.2), compararam-se os perfis obtidos a partir dos isolados do final da fermentação com os das estirpes que foram utilizadas como inóculo.

2.5 ANÁLISES QUÍMICAS

A quantificação de frutose, de glucose, de etanol, de glicerol e de ácido acético, foi efetuada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), de acordo com o método descrito no capítulo IV (2.3.3).

Foi efetuada a determinação semiquantitativa do 2,3-butanodiol através do método descrito por Peinado (2004), ligeiramente modificado, utilizando um sistema GC-MS constituído por um cromatógrafo gasoso Varian 3400 GC e um espectrómetro de massas *ion-trap* Varian Saturn II. Foi utilizada uma coluna CP-Wax 52 CB (Chrompack), o Hélio (Air Liquide N60) como gás de transporte e o detetor foi usado em modo de impacto electrónico.

2.6 ANÁLISE DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO AROMA

Determinaram-se os compostos voláteis do aroma nos vinhos de 2010 e nos de 2011, das castas de uvas brancas *Loureiro* e *Batoca*. A partir de amostras de vinhos recolhidas no final das fermentações, a análise efetuou-se de acordo com um método previamente descrito (Oliveira et al., 2009), utilizando o sistema GC-MS referido em 2.5, uma coluna CP-Wax 52 CB (Chrompack), o Hélio (Air Liquide N60) como gás de transporte e o detetor foi usado em modo de impacto electrónico. Todos os compostos foram identificados por comparação do espectro de massas e do tempo de retenção com os de substâncias de referência (Saturn versão 5.2, Varian), e quantificados como equivalentes de 4-nonanol. Determinou-se o valor da atividade de odor (OAV), dividindo a concentração de cada composto pelo seu limiar de perceção, e considerou-se que apenas os valores superiores a 1 têm impacto no aroma (Guth, 1997).

2.7 ANÁLISE SENSORIAL

Os vinhos produzidos em 2010 foram avaliados por um painel de 34 provadores, treinados e não treinados. A análise sensorial avaliou o aroma (intensidade, floral, frutos tropicais, citrinos, frutos de árvore, frutos secos, especiarias, mineral e vegetal) e o sabor (doçura, acidez, calor, amargor, estrutura, equilíbrio e persistência) numa escala de 0 (não

percetível) a 5 (muito forte). O processamento estatístico dos dados, foi realizado utilizando o software SPSS® 18.0 for Windows (SPSS Inc., Chigaco, Illinois, USA).

2.8 DETERMINAÇÃO DE TIÓIS VOLÁTEIS

A análise aos principais tióis voláteis (4MMP, 3MH e 3AMH) foi realizada pelo laboratório Excell Ibéria, que utilizou o método de extração/derivatização – GC/MS. A determinação destes compostos foi realizada nas amostras de vinho recolhidas no final das fermentações, efetuadas em 2011 na casta *Loureiro* com as estirpes D3 e Lalvin QA23®.

3 RESULTADOS

A estirpe de *S. cerevisiae* (D3) foi selecionada num estudo anterior (Capítulo IV) em microfermentações realizadas à escala laboratorial e num mosto constituído por uma mistura das castas *Loureiro* e *Avesso*. Esta levedura demonstrou ter um melhor rendimento na produção de etanol, fermentou mais rapidamente e produziu uma concentração de glicerol superior, comparativamente à estirpe comercial usada como referência (Lalvin QA23®). Adicionalmente conferiu ao vinho um intenso aroma a frutos tropicais. Os testes fenotípicos revelaram que esta levedura é resistente a 100 mg/L de SO₂, tolera 14% (v/v) de etanol, tem um baixo potencial de produção de H₂S, uma atividade β-glucosidásica intermédia e relativamente ao fenótipo *killer* classifica-se como neutra.

Em 2010, foram realizadas as primeiras fermentações à escala piloto com a estirpe D3 em paralelo com a comercial Lalvin QA23®, nas condições anteriormente descritas (2.2). Pela observação da Figura V-1 (A) verifica-se que o perfil da fermentação realizada com a estirpe D3 foi semelhante ao da estirpe comercial no início da fermentação, e foi ligeiramente mais eficiente na fase final da fermentação. A meio das fermentações (entre o dia 3 e o dia 4) os perfis apresentaram uma pequena alteração, que correspondeu ao procedimento de clarificação com bentonite sódica. As concentrações dos produtos de fermentação (etanol e glicerol), açúcares residuais (glucose e frutose) e ácidos orgânicos (tartárico, málico, acético e succínico) dos dois vinhos obtidos estão representadas na Figura V-1 (B).

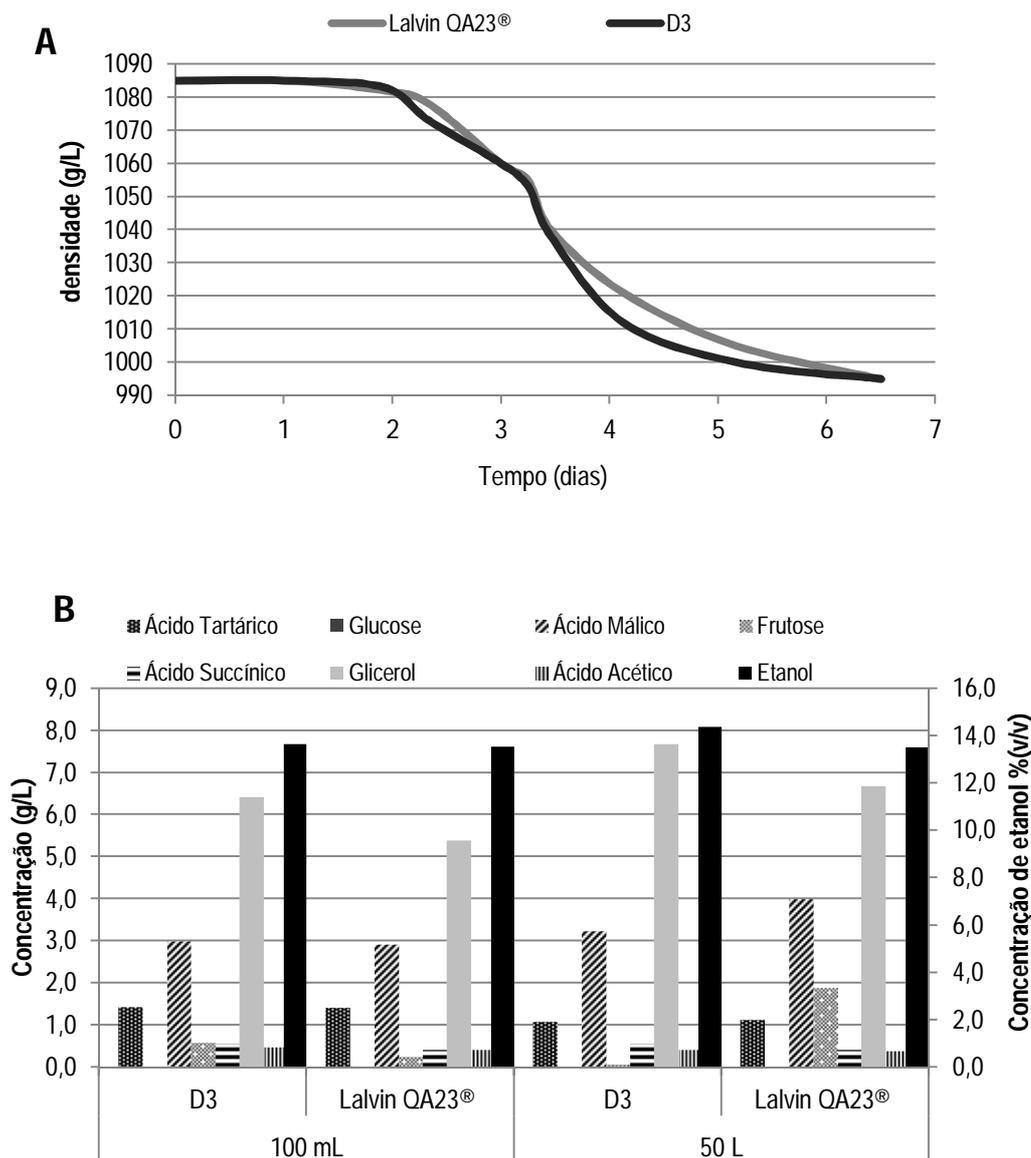


Figura V-1: (A) Perfil das fermentações efetuadas com as estirpes D3 e Lalvin QA23®, realizadas a 18 °C, em 50 L de um mosto de 2010 constituído pela mistura das castas *Loureiro* e *Avesso* e (B) concentrações dos compostos químicos (frutose, glucose, etanol, glicerol, ácido acético, ácido tartárico, ácido málico e ácido succínico) presentes nos vinhos obtidos no volume de 50 L em comparação com as concentrações observadas nos vinhos fermentados em 100 mL.

No capítulo IV apresentaram-se os dados comparativos nas microfermentações de 100 mL. Relativamente aos resultados obtidos no volume de 50 L, o vinho produzido com a estirpe *S. cerevisiae* D3 apresentou concentrações mais elevadas de etanol e glicerol, e menor concentração de frutose, o que é concordante com o melhor desempenho observado no final da fermentação com esta estirpe. A concentração dos ácidos orgânicos foi semelhante nos dois vinhos, à exceção do ácido málico que foi superior no vinho produzido com a levedura comercial

e do ácido succínico que foi ligeiramente maior no vinho obtido com a estirpe D3. Desta forma, excluindo a concentração de ácido málico, os resultados obtidos nas fermentações de 50 L foram comparáveis aos observados nas microfermentações realizadas anteriormente, na medida em que os vinhos fermentados com a estirpe D3 também apresentaram concentrações de glicerol e etanol superiores relativamente à levedura comercial. Embora as fermentações nas duas escalas (100 mL e 50 L) tenham sido efetuadas com o mesmo mosto, foram realizadas em situações temporais diferentes. Além do mais, o mosto utilizado nas microfermentações foi filtrado, o que pode justificar as pequenas diferenças das concentrações observadas entre as escalas. A implantação das leveduras inoculadas foi verificada pela análise das sequências interdelta dos isolados de levedura recolhidos no final das fermentações em 50 L (dados não apresentados).

Em 2011 foram realizados novos ensaios de comparação das duas estirpes (D3 e Lalvin QA23[®]) em dois mostos, da casta *Loureiro* e da casta *Batoca*, nas condições descritas anteriormente (Tabela V-1). Foram também realizadas fermentações em diferentes volumes (0,1 L, 5 L, 50 L e 500 L) de mosto de *Loureiro* com a estirpe D3, sendo as fermentações de 0,1, 5 e 50 L realizadas à temperatura de 18 °C e a de 500 L a 16 °C. Testou-se ainda o comportamento fermentativo da estirpe D3 noutros mostos nomeadamente *Alvarinho*, *Chardonnay*, *Sauvignon blanc*, *Riesling*, *Gewurztraminer*, *Touriga nacional*, *Cabernet sauvignon*, *Merlot* e *Syrah*, às temperaturas e nos volumes mencionados na Tabela V-1.

De forma a avaliar se as fermentações foram realizadas predominantemente com as leveduras inoculadas, recolheram-se vinte isolados de levedura no final de cada fermentação e foi efetuada a análise das sequências interdelta. Em todas as fermentações, os perfis eletroforéticos do conjunto dos vinte isolados foram idênticos, pelo que se escolheu aleatoriamente um isolado de levedura representativo de cada perfil. A Figura IV-2 apresenta a eletroforese em gel de agarose dos perfis resultantes da análise das sequências interdelta ao DNA das estirpes inoculadas (D3 e Lalvin QA23[®]) e dos isolados representativos de cada uma das fermentações.

Pela comparação dos perfis das bandas obtidas (Figura V-2) verifica-se que todas as fermentações foram conduzidas pelas estirpes inoculadas, o que permite concluir que a estirpe selecionada D3 conseguiu implantar-se com sucesso (em 100% dos isolados recolhidos) nos diversos mostos de castas brancas e tintas e nas fermentações realizadas em diferentes escalas.

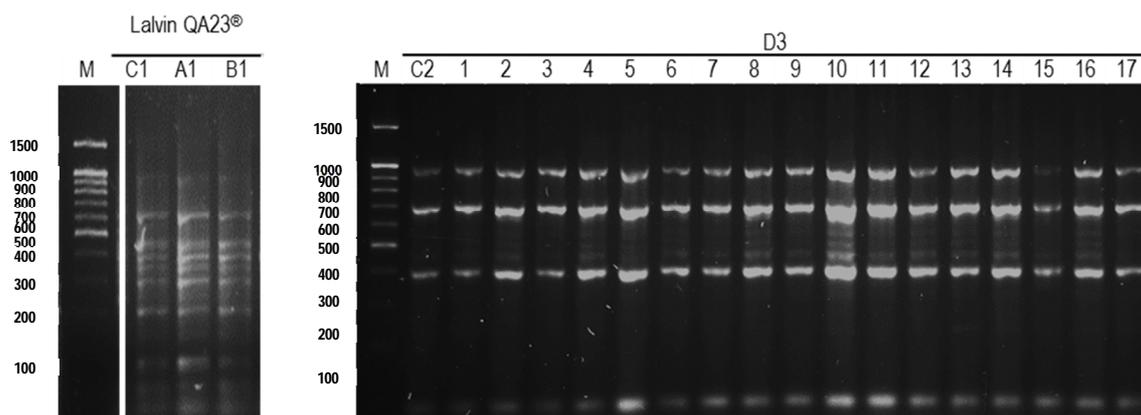


Figura V-2: Comparação dos perfis de amplificação de sequências interdelta representativos dos isolados de levedura recolhidos no final das fermentações realizadas em diferentes mostos e/ou volumes, com os perfis obtidos a partir das estirpes inoculadas (M - marcador de peso molecular; C1 – estirpe Lalvin QA23[®] inoculada; C2 – estirpe D3 inoculada; A1 – *Loureiro*, 1000 L; B1 – *Batoca*, 5 L; 1 - *Sauvignon Blanc*, 50 L; 2 - *Alvarinho*, 50 L; 3 - *Loureiro*, 5 L, 1; 4 - *Loureiro*, 5 L, 2; 5 - *Loureiro*, 5 L, 3; 6 - *Batoca*, 5 L; 7 - *Cabernet Sauvignon*, 50 L; 8 - *Chardonnay*, 5 L; 9 - *Riesling*, 5 L; 10 - *Loureiro*, 50 L; 11 - *Loureiro* 500 L; 12 - *Merlot*, 50 L; 13 - *Syrah*, 50 L; 14 - *Touriga Nacional*, 50 L; 15 - *Loureiro*, 0,1 L, 1; 16 - *Loureiro*, 0,1 L, 2; 17 - *Loureiro*, 0,1 L, 3).

Os perfis das fermentações realizadas em diferentes volumes da casta *Loureiro* e com a estirpe D3 encontram-se representados na Figura V-3 (A). As fermentações que foram conduzidas à temperatura de 18 °C mostraram semelhanças do seu perfil fermentativo. Verificou-se uma maior reprodutibilidade dos perfis das três réplicas independentes no volume de 5 L do que no de 0,1 L. A monitorização das fermentações no volume de 100 mL foi efetuada pela perda de massa ao longo do tempo e a das fermentações em 5 e 50 L pela medição da densidade, pelo que não podemos comparar com rigor a duração de fermentação (10 dias nos volumes de 5 e 50 L e 13 dias no volume de 0,1 L). Em relação ao perfil fermentativo no volume de 500 L, verificou-se que o tempo de fermentação foi significativamente superior (mais oito dias que as fermentações em 5 e 50 L), o que era expectável uma vez que a fermentação decorreu a 16 °C (Tabela V-1). Esta diferença na temperatura de fermentação foi assumida devido ao facto de na EVAG as fermentações de 1000 L, com a levedura comercial Lalvin QA23[®] e no mesmo mosto de *Loureiro*, serem realizadas nestas condições, o que nos permitiu comparar os compostos químicos nos vinhos obtidos com as duas leveduras (resultados apresentados posteriormente). A Figura V-3 (B) apresenta os compostos químicos resultantes do metabolismo primário presentes nos vinhos obtidos pelas fermentações com diferentes volumes. À exceção da fermentação no volume de 100 mL, as concentrações dos principais compostos (etanol, glicerol, ácido málico, ácido acético e ácido succínico) foram semelhantes. Relativamente à

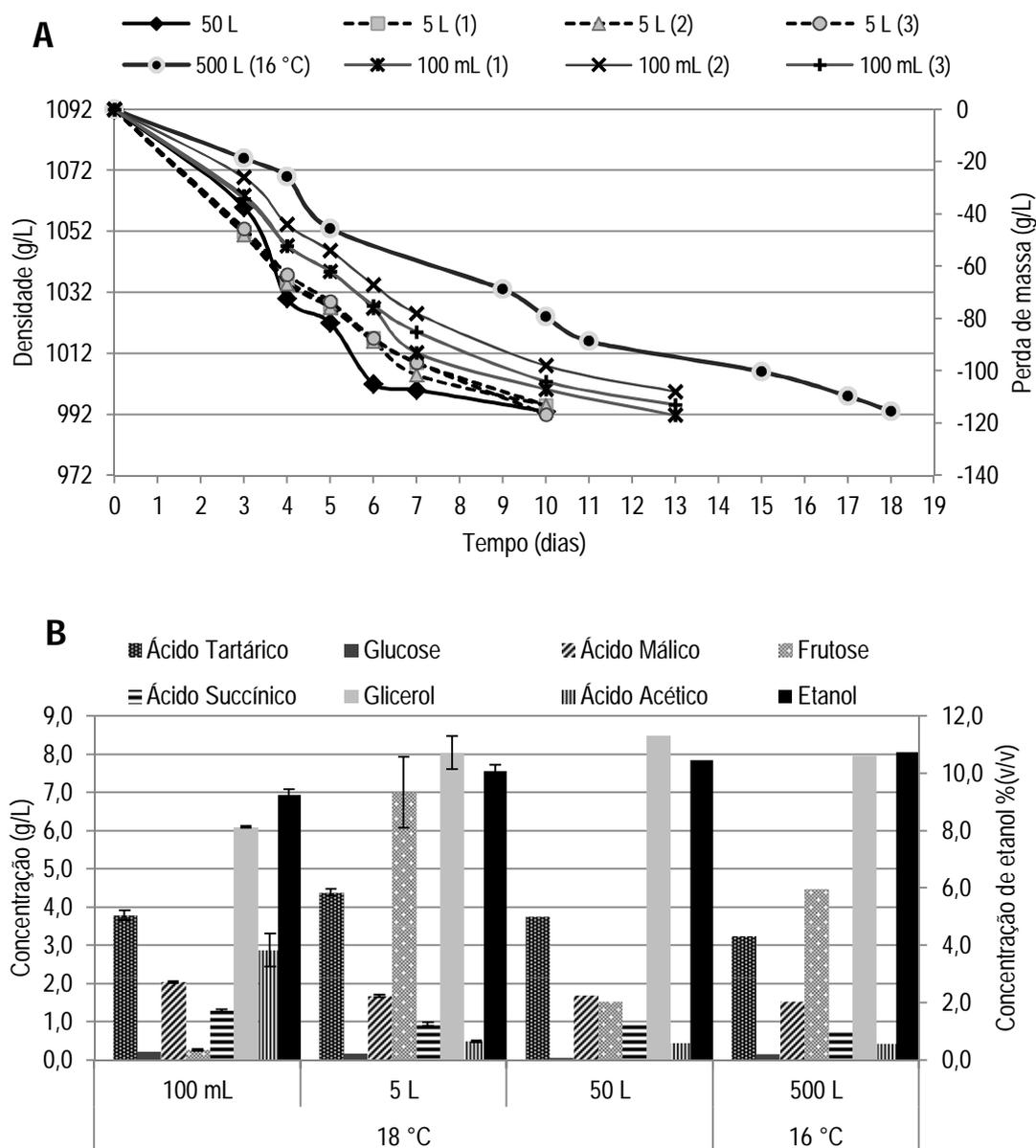


Figura V-3: Perfil das fermentações realizadas em 2011 com a estirpe D3 em mosto da casta *Loureiro*, a 18 °C e em diferentes volumes (100 mL, 5L e 50 L), e a 16 °C em 500L (**A**); e comparação das concentrações dos compostos químicos (frutose, glucose, etanol, glicerol, ácido acético, ácido tartárico, ácido málico e ácido succínico) presentes nos vinhos obtidos nas diferentes condições (**B**). As barras de erro representam o desvio padrão da média das três réplicas independentes.

concentração de frutose observou-se que os valores variaram entre 1 g/L, na fermentação de 50 L, e 7 g/L, a média das fermentações de 5 L, que reflete as pequenas diferenças de densidade no final das respetivas fermentações (993, na de 50 L, e 992, 995 e 995, nas de 5 L). Na fermentação de 100 mL, observou-se concentrações inferiores de etanol e de glicerol, e superiores de ácido acético, de ácido málico e de ácido succínico, comparativamente às

verificadas nos outros volumes. Com efeito, o valor de ácido acético (2,9 g/L) nas fermentações de 100 mL foi muito superior ao limite de deteção sensorial, que se encontra no intervalo de 0,7 a 1,1 g/L, dependendo do estilo de vinho (Lambrechts and Pretorius, 2000), e ao legalmente permitido nos vinhos brancos e rosés, 18 meq./L (Reg. (CE) nº 606/2009, Anexo I C- 1 b). Das várias fermentações realizadas no volume de 100 mL (Capítulo IV), nunca se observou um valor tão elevado de ácido acético, o que nos leva a supor que este resultado se deveu, muito provavelmente, a uma contaminação destas microfermentações no ambiente de adega. O ácido tartárico é estável à degradação pelos microrganismos durante a fermentação (Swiegers et al., 2005; Ugliano and Henschke, 2009), pelo que a variação dos valores nas diferentes condições de fermentação se deveu muito provavelmente a perdas durante o processo de conservação da amostra (congelamento, que o precipita na forma de tartaratos) e processamento da amostra antes da análise (filtração, que pode reter sais que não estejam completamente dissolvidos).

Na Figura V-4 são apresentados os perfis das fermentações dos mostos de uvas de castas brancas, realizadas a 18 °C (A) e tintas, realizadas a 25 °C (B). Os tempos de fermentação variaram entre 7 a 14 dias para as castas de uvas brancas e entre 4 e 7 dias para as castas de uvas de tintas. Como foram testados vários mostos, o que obviamente se traduz em diferenças na composição química dos mesmos, os perfis fermentativos observados foram distintos, particularmente nas castas de uvas brancas. Por exemplo, a fermentação do mosto da casta *Riesling* parou à densidade de 1020 e só voltou a fermentar após adição de nutrientes. A fermentação da casta *Gewurztraminer* foi a mais rápida, mas a concentração inicial de açúcares era muito baixa (Tabela V-1). Relativamente aos mostos de castas de uvas tintas, os perfis foram muito semelhantes à exceção da casta *Merlot*, cuja fermentação foi mais demorada. Porém, como este foi o mosto que apresentou a maior concentração inicial de açúcares (Tabela V-1), o atraso na finalização da fermentação deveu-se, muito provavelmente, a este facto.

A Figura V-5 resume os resultados das análises dos principais compostos químicos dos vinhos das diferentes castas, obtidos com a estirpe selecionada D3, e dos vinhos das castas *Batoca* e *Loureiro* que fermentaram em paralelo com estirpe comercial Lalvin QA23[®]. Comparando os resultados dos dois vinhos da casta *Batoca* verifica-se que os valores da concentração de etanol foram semelhantes e que o da concentração de glicerol, no vinho obtido com a estirpe D3, foi ligeiramente superior. Contrariamente, a concentração de ácido málico foi superior no vinho resultante da fermentação com a estirpe comercial. Relativamente aos vinhos da casta *Loureiro*, que fermentaram a 16 °C, os valores da concentração de glicerol foram

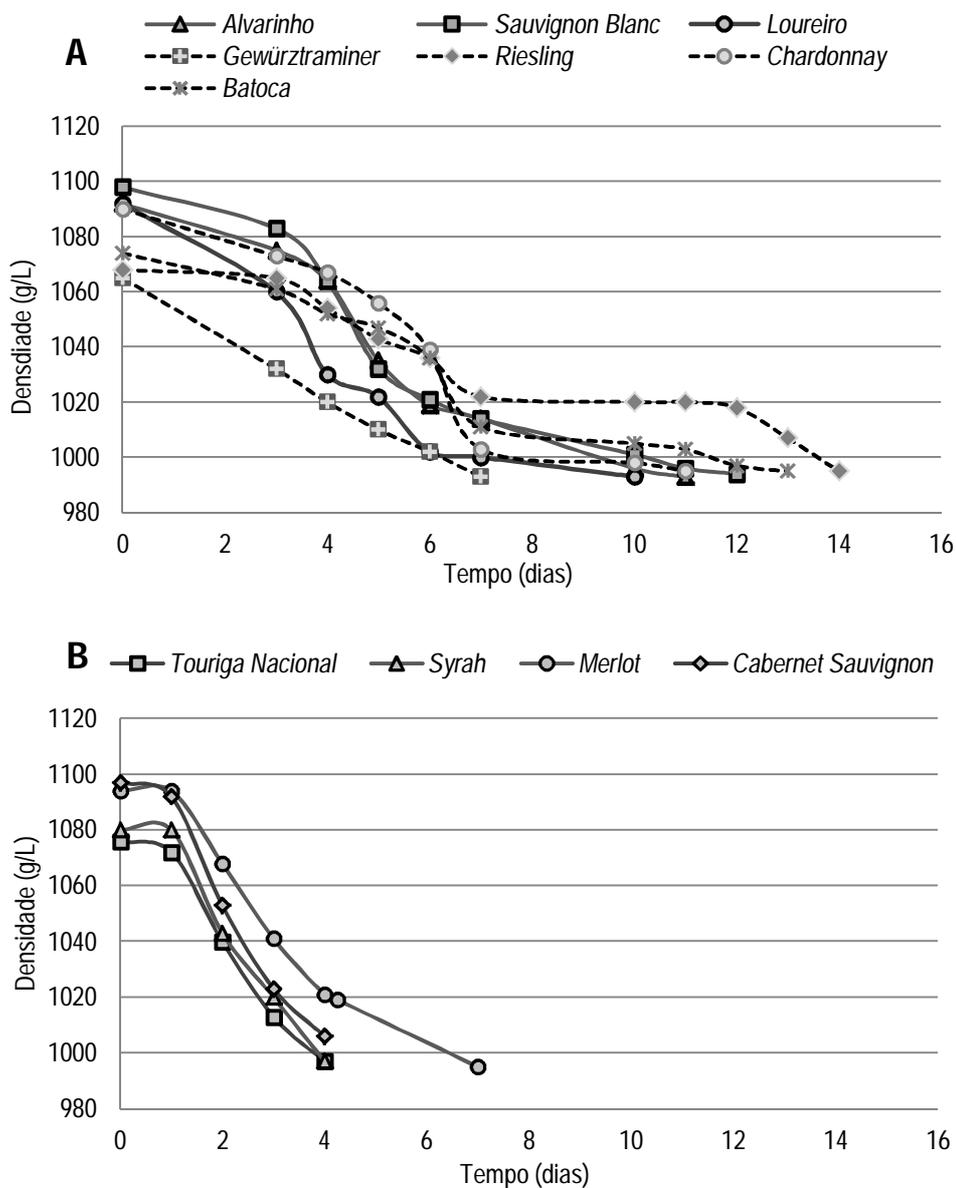


Figura V-4: Perfil das fermentações realizadas com a estirpe D3 em mostos de diferentes castas de uvas brancas (*Batoca*, 5 L, *Chardonnay*, 5 L, *Gewurztraminer*, 5 L, *Riesling*, 5 L, *Sauvignon Blanc*, 50 L, *Loureiro*, 50 L, *Alvarinho*, 50 L), fermentadas a 18 °C (**A**), e mostos de diferentes castas de uvas tintas (*Merlot*, 50 L, *Syrah*, 50 L, *Touriga Nacional* 50 L, e *Cabernet Sauvignon*, 50 L), fermentadas a 25 °C (**B**).

semelhantes nos dois vinhos e observou-se uma concentração de etanol ligeiramente superior no vinho obtido com a estirpe *Lalvin QA23*[®]. A diferença de resultados, relativamente aos observados em fermentações anteriores que foram conduzidas a 18 °C (Figura V-1, B; Figura V-5, *Batoca*), sugere que, possivelmente, a levedura *Lalvin QA23*[®] tem um rendimento alcoólico

superior a 16 °C, em comparação com a D3. No entanto, como temos apenas uma observação a 16 °C, serão necessários testes adicionais para comprovar este indício.

Geralmente, os vinhos têm concentrações de glicerol entre 5 e 9 g/L (Noble and Bursick, 1984), embora possam variar entre 1 e 15 g/L (Scanes et al., 1998). O glicerol contribui positivamente para o corpo e doçura do vinho e o limiar de percepção deste composto no sabor é de 5,2 g/L (Noble and Bursick, 1984). Verificou-se que todos os vinhos analisados obtiveram concentrações de glicerol superiores ao limiar de percepção de glicerol no vinho (Figura V-5). As concentrações produzidas nas fermentações dos diferentes mostos com a estirpe D3 variaram entre 5,8 e 13,1 g/L, sendo o valor inferior obtido com a casta *Gewurztraminer* e o superior com a casta *Merlot*. De referir que foram também nestas duas castas que se verificaram as concentrações mais baixa e mais elevada de açúcar inicial.

Observando separadamente as castas de uvas brancas e as castas de uvas tintas (à exceção da *Syrah*), verifica-se que valores de glicerol mais elevados foram obtidos nas castas com concentrações mais elevadas de açúcar inicial. No entanto, se comparamos as castas de uvas tintas *Touriga nacional* e *Cabernet sauvignon* com as castas de uvas brancas, verifica-se que, apesar de terem concentrações de açúcar inicial mais baixas, obtiveram valores de glicerol mais elevados. Em geral, os vinhos das castas de uvas tintas apresentaram valores de glicerol mais elevados, à exceção da casta *Syrah* que apresentou uma concentração ligeiramente inferior a duas castas de uvas brancas (*Alvarinho* e *Sauvignon blanc*).

A concentração de ácido acético variou entre 0,2 e 0,6 g/L, ou seja, foi inferior ao limite de deteção sensorial que se encontra no intervalo de 0,7 a 1,1 g/L (Lambrechts and Pretorius, 2000). Relativamente à concentração de etanol obtiveram-se valores entre 8,2 e 13,5 % (v/v), nos vinhos das castas *Gewurztraminer* e *Alvarinho*, respetivamente.

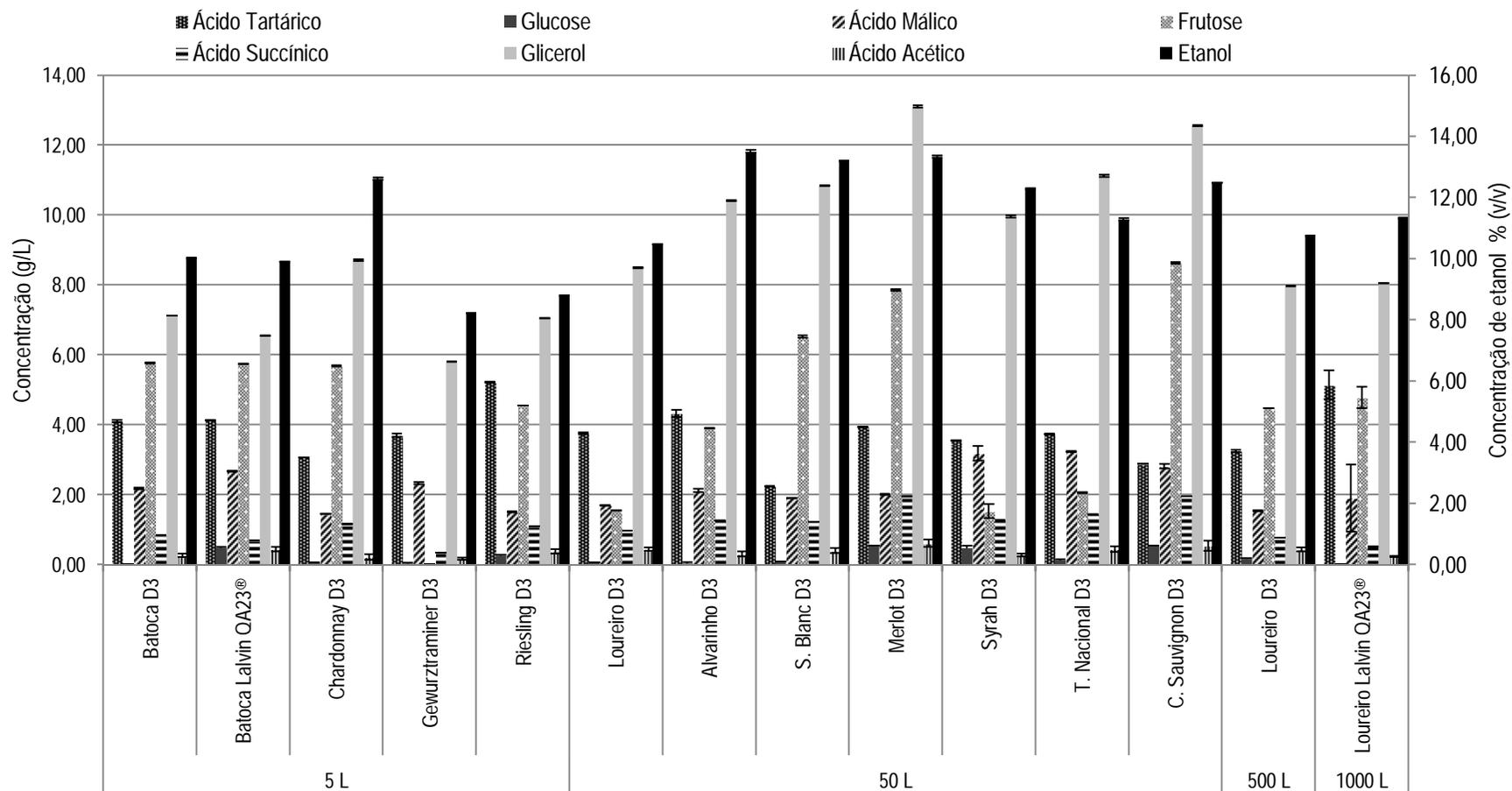


Figura V-5: Concentrações dos compostos químicos (frutose, glucose, etanol, glicerol, ácido acético, ácido tartárico, ácido málico e ácido succínico) presentes nos vinhos obtidos a partir das fermentações realizadas com a estirpe D3 em diferentes volumes de mostos de diversas castas (*Batoca*, 5 L, *Chardonnay*, 5 L, *Gewurztraminer*, 5 L, *Riesling*, 5 L, *Sauvignon Blanc*, 50 L, *Loureiro*, 50 L e 500 L, *Alvarinho*, 50 L, *Merlot*, 50 L, *Syrah*, 50 L, *Touriga Nacional* 50 L, e *Cabernet Sauvignon*, 50 L) e das fermentações realizadas com a estirpe Lalvin QA23® nos mostos das castas *Batoca* (5 L) e *Loureiro* (1000 L).

A Tabela V-2 apresenta os resultados do rendimento de etanol e de glicerol, calculados pela razão entre a quantidade de composto (g) presente no final da fermentação, e a quantidade de açúcar consumido (g).

Tabela V-2: Rendimento de etanol (Y etanol) e rendimento de glicerol (Y glicerol) determinado nos vinhos obtidos a partir das fermentações realizadas com as estirpes D3 e Lalvin QA23[®], em mostos de diferentes castas e em diversas condições de volume e temperatura.

Casta	Ano	V (L)	Levedura	T (°C)	Y etanol (g etanol/g açúcar consumido)	Y glicerol (g glicerol/g açúcar consumido)
Mistura de <i>Loureiro</i> e <i>Avesso</i>	2010	50	D3	18	0,502	0,034
Mistura de <i>Loureiro</i> e <i>Avesso</i>	2010	50	QA23 [®]	18	0,476	0,030
<i>Loureiro</i>	2011	0,1	D3	18	0,381	0,032
<i>Loureiro</i>	2011	5	D3	18	0,431	0,044
<i>Loureiro</i>	2011	50	D3	18	0,434	0,045
<i>Loureiro</i>	2011	500	D3	16	0,453	0,042
<i>Loureiro</i>	2011	1000	QA23 [®]	16	0,477	0,043
<i>Alvarinho</i>	2011	50	D3	18	0,498	0,049
<i>Sauvignon blanc</i>	2011	50	D3	18	0,491	0,051
<i>Batoca</i>	2011	5	D3	18	0,470	0,042
<i>Batoca</i>	2011	5	QA23 [®]	18	0,466	0,039
<i>Chardonnay</i>	2011	5	D3	18	0,490	0,043
<i>Riesling</i>	2011	5	D3	18	0,441	0,045
<i>Gewurztraminer</i>	2011	5	D3	18	0,448	0,040
<i>Merlot</i>	2011	50	D3	25	0,459	0,057
<i>Cabernet sauvignon</i>	2011	50	D3	25	0,476	0,061
<i>Touriga nacional</i>	2011	50	D3	25	0,512	0,064
<i>Syrah</i>	2011	50	D3	25	0,508	0,052

Como era expectável, os valores do rendimento foram diferentes de acordo com as diversas castas, variando entre 0,381 e 0,512 para o etanol e entre 0,030 e 0,064 para o glicerol. As fermentações que foram realizadas a 18 °C com as estirpes D3 e Lalvin QA23[®] em paralelo (castas *Batoca* e mistura de *Loureiro* e *Avesso*) mostraram que os vinhos que alcançaram rendimentos superiores dos dois compostos foram os fermentados com a estirpe D3. Pelo contrário, nas fermentações realizadas a 16 °C com a casta *Loureiro*, o vinho que obteve rendimentos mais elevados foi o fermentado com a levedura comercial. Pela comparação das fermentações em diferentes volumes, a 18 °C com a estirpe D3 na casta *Loureiro*, verificou-se que o rendimento dos dois compostos foi superior nos volumes maiores, sendo a fermentação realizada em 0,1 L a que apresentou pior desempenho.

Na Tabela V-3 encontram-se os valores médios dos compostos voláteis do aroma dos vinhos obtidos pela fermentação com as estirpes Lalvin QA23® e D3, dos mostos das castas *Loureiro* (2011), *Batoca* (2011), e mistura de *Loureiro* e *Avesso* (2010). No total foram identificados e quantificados, por GC-MS, 71 compostos do aroma entre os quais, três compostos em C6, 13 álcoois superiores, sete ésteres etílicos de ácidos gordos, oito ésteres etílicos de ácidos fixos, seis acetatos, seis álcoois monoterpénicos, sete óxidos e dióis monoterpénicos, dois norisoprenóides em C13, cinco fenóis voláteis, oito ácidos gordos voláteis, três compostos carbonilados e ainda a 2-metiltetrahidrotiofeno-3-ona, a pantolactona e a N-(2-feniletil)-acetamida.

Na Figura V-6 apresenta-se o somatório das concentrações dos compostos do aroma quantificados para cada família, nos seis vinhos analisados por GC-MS (Tabela V-3). Das dez famílias de compostos identificados e quantificados, os álcoois superiores são quantitativamente o maior grupo para todos os vinhos, e os C13-norisoprenóides o menor. Todos os vinhos produzidos com a estirpe D3 apresentam teores superiores de compostos em C6, de álcoois superiores, de ésteres etílicos de ácidos fixos, de acetatos, de álcoois monoterpénicos, de óxidos e dióis monoterpénicos, de C13-norisoprenóides e de fenóis voláteis, comparativamente aos produzidos com a estirpe Lalvin QA23®.

Tabela V-3: Teor médio (C) e desvio padrão dos compostos voláteis da fração livre do aroma dos vinhos obtidos pela fermentação com as estirpes Lalvin QA23® e D3, dos mostos das castas *Loureiro* (2011), *Batoca* (2011), e mistura de *Loureiro* e *Avesso* (2010). Valor da atividade de odor (O.A.V.) dos compostos para os quais é conhecido o Limiar olfativo (L.O.), e os descritores aromáticos correspondentes.

Descritor aromático ^a	L.O. ^a (µg/L)	Mistura de <i>Loureiro</i> e <i>Avesso</i> 2010				<i>Loureiro</i> 2011				<i>Batoca</i> 2011				
		Lalvin QA23®		D3		Lalvin QA23®		D3		Lalvin QA23®		D3		
		C(µg/L)	O.A.V.	C(µg/L)	O.A.V.	C(µg/L)	O.A.V.	C(µg/L)	O.A.V.	C(µg/L)	O.A.V.	C(µg/L)	O.A.V.	
Compostos em C6														
Hexanol	herbáceo, verde	8000	332,4 ± 1,5	0,04	413,2 ± 20,3	0,05	230,4 ± 7,4	0,03	271,1 ± 20,5	0,03	117,9 ± 10,3	0,01	136,7 ± 3,8	0,02
(E)-3-hexeno -1-ol	erva cortada	400	18,1 ± 8,3	0,05	28,2 ± 0,1	0,07	27,4 ± 2,0	0,07	28,9 ± 1,0	0,07	1,8 ± 0,4	0,00	2,5 ± 0,3	0,01
(Z)-3-hexeno -1-ol	erva cortada	101	56,7 ± 9,9	0,56	62,4 ± 1	0,62	2,9 ± 0,1	0,03	5,7 ± 0,8	0,06	45,8 ± 3,1	0,45	49,5 ± 5,9	0,49
total			407,2		503,8		260,8		305,7		165,5		188,6	
Alcoois														
1-butanol		150000					nd	--	11,6 ± 0,3	0,00	2,6 ± 1,8		2,0 ± 0,6	0,00
4-metil-1-pentanol							4,3 ± 0,1		12,5 ± 0,5		nd	--	nd	--
3-metil-1-pentanol		500					27,0 ± 0,7	0,05	31,2 ± 2,8	0,06	27,6 ± 2,1		30,8 ± 2,0	0,06
1-heptanol		300					nd	--	163,8 ± 50,3	0,55	nd	--	78,3 ± 17,7	0,26
2-metil-1-propanol	amargo, verde, áspero	65000	275,4 ± 26,1	0,00	693,4 ± 64,6	0,01	166,8 ± 6,1	0,00	384,0 ± 34,0	0,01	195,2 ± 5,7	0,00	433,0 ± 71,5	0,01
2-metil-1-butanol + 3- metil-1-butanol	alcoool, banana, doce	7000	9918,9 ± 2855,2	1,42	15626,4 ± 357,6	2,23	12207,0 ± 696,5	1,74	14612,2 ± 1636,3	2,09	12838,1 ± 1193,3	1,83	16374,2 ± 1961,8	2,34
3-etoxi-1-propanol	solventes orgânicos		34,8 ± 1,0		nd	--								
1-octeno-3-ol	cogumelos, lavanda, rosa e feno	20	6,6 ± 0,6	0,33	nd	--								
1-octanol	citrínos, laranja doce	900	7,5 ± 0,4	0,01	8,1 ± 1,1	0,01								
3-metil-1-propanol (metionol)	carne, manteiga	1000	47,6 ± 3,0	0,05	65,4 ± 4,5	0,07	20,7 ± 0,9	0,02	26,5 ± 0,8	0,03	30,0 ± 3,0	0,03	17,8 ± 2,3	0,02
alcoool benzílico	doce e frutado	5500	2,8 ± 0,8	0,00	4,8 ± 0,7	0,00	5,1 ± 0,7	0,00	6,3 ± 1,4	0,00	2,9 ± 0,5	0,00	3,0 ± 0,4	0,00
2-feniletanol	rosa, adocicado	7500	4724,3 ± 132,8	0,63	5709,8 ± 696,2	0,76	5496,6 ± 248,4	0,73	7086,3 ± 656,9	0,94	7808,5 ± 962,8	1,04	8593,0 ± 887,7	1,15
tirosol	amargo, químico		56,6 ± 9,1		77,3 ± 12,4		41,1 ± 7,5		58,4 ± 7,8		62,6 ± 10,2		65,4 ± 14,0	
total			15074,5		22185,2		17975,2		22400,5		20972,2		25601,1	

Tabela V-3: Continuação.

Descritor aromático ^a	L.O. ^a (µg/L)	Mistura de Loureiro e Avesso 2010				Loureiro 2011				Batoca 2011			
		Lalvin QA23®		D3		Lalvin QA23®		D3		Lalvin QA23®		D3	
		C(µg/L)	O.A.V.	C(µg/L)	O.A.V.	C(µg/L)	O.A.V.	C(µg/L)	O.A.V.	C(µg/L)	O.A.V.	C(µg/L)	O.A.V.
Ésteres de ácidos gordos													
propionato de etilo	1800					12,8 ± 0,1	0,01	13,8 ± 2,4	0,01	10,3 ± 2,1	0,01	5,2 ± 3,2	0,00
butirato etilo	20	117 ± 12,9	5,85	165,1 ± 15,4	8,26	323,3 ± 30,4	16,16	216,4 ± 24,9	10,82	85,4 ± 3,2	4,27	74,4 ± 6,6	3,72
hexanoato etilo	14	536,3 ± 13,8	38,31	352,3 ± 8,8	25,16	999,6 ± 8,0	71,40	739,8 ± 94,1	52,84	438,1 ± 15,4	31,29	335,8 ± 24,5	23,98
octanoato etilo	5	1023,8 ± 14,5	204,76	824,3 ± 79,9	164,86	1197,5 ± 20,0	239,49	967,0 ± 22,9	193,39	381,2 ± 13,6	76,25	340,7 ± 11,5	68,14
decanoato etilo	200	636,5 ± 3,2	3,18	520,9 ± 22,7	2,60	490,1 ± 10,2	2,45	334,3 ± 12,6	1,67	193,3 ± 11,0	0,97	211,9 ± 13,9	1,06
9-decenoato de etilo	100	39 ± 2,8	0,39	225,3 ± 19,9	2,25	19,3 ± 1,0	0,19	217,5 ± 10,2	2,18	57,5 ± 3,0	0,58	120,0 ± 7,9	1,20
dodecanoato etilo		35,6 ± 13,7		25,5 ± 2,6									
total		2388,2		2113,4		3042,6		2488,8		1165,9		1087,9	
Ésteres de ácidos fixos													
lactato etilo	14000	84,2 ± 3,6	0,01	99,6 ± 8,7	0,01	157,4 ± 3,3	0,01	186,8 ± 10,1	0,01	112,9 ± 11,4	0,01	141,2 ± 11,9	0,01
3-hidroxibutanoato etilo	20000					22,8 ± 1,1	0,00	24,0 ± 1,8	0,00	10,3 ± 0,4		11,7 ± 0,6	0,00
3-hidroxibutirato etilo	1000	13,4 ± 1,2	0,01	15,6 ± 1,7	0,02								
2-furancarboxilato etilo		3,5 ± 0,5		nd	--	1,8 ± 0,1		2,4 ± 0,6		0,8 ± 0,1		1,2 ± 0,2	
succinato dietilo	100000	56,3 ± 16,4	0,00	160,4 ± 5,6	0,00	185,6 ± 8,6	0,00	223,9 ± 7,2	0,00	249,5 ± 10,2	0,00	263,7 ± 4,3	0,00
malato dietilo		33,6 ± 2,7		39 ± 5,4		149,6 ± 5,5		122,0 ± 6,5		221,2 ± 33,1		214,5 ± 3,9	
glutarato dietilo						3,7 ± 0,2		3,0 ± 0,1		nd	--	nd	--
succinato monoetilo	-	197,9 ± 6,1		364,6 ± 15,1									
total		388,9		679,2		520,9		562,1		594,7		632,2	
Acetatos													
acetato isobutilo	1825					39,2 ± 2,0	0,02	41,2 ± 6,5	0,02	12,4 ± 2,3	0,01	23,5 ± 2,6	0,01
acetato isoamilo	30	950,6 ± 30,7	31,69	1970,3 ± 50,5	65,68	1825,7 ± 254,7	60,86	3229,8 ± 113,4	107,66	540,9 ± 22,5	18,03	823,5 ± 57,7	27,45

Tabela V-3: Continuação.

			Mistura de Loureiro e Avesso 2010				Loureiro 2011				Batoca 2011				
Descritor aromático ^a	L.O. ^a (µg/L)	Lalvin QA23®		D3		Lalvin QA23®		D3		Lalvin QA23®		D3			
		C/(µg/L)	O.A.V.	C/(µg/L)	O.A.V.	C/(µg/L)	O.A.V.	C/(µg/L)	O.A.V.	C/(µg/L)	O.A.V.	C/(µg/L)	O.A.V.		
Acetatos (cont.)															
acetato 2-metilpropilo	doce, frutado			14,7 ± 1,7		14,3 ± 1,8									
acetato hexilo	frutado	670		215,2 ± 7,7	0,32	154,4 ± 0,8	0,23	214,8 ± 5,0	0,32	118,2 ± 4,3	0,18	36,8 ± 0,6	0,05	59,9 ± 3,5	0,09
acetato (Z)-3-Hexenilo				18,7 ± 0,6		17,8 ± 1,9		11,2 ± 0,5		5,6 ± 0,2		nd	--	nd	--
acetato 2-feniletilo	rosa, mel, tabaco	250		371,2 ± 0,8	1,48	304,7 ± 30,8	1,22	634,2 ± 6,7	2,54	513,8 ± 4,5	2,06	119,2 ± 3,7	0,48	222,8 ± 3,5	0,89
total				1570,4		2461,5		2725,1		3908,7		709,3		1129,8	
Alcoois monoterpénicos															
linalol	anis, floral, rosa	25		9,0 ± 0,5	0,36	9,1 ± 1,3	0,36	174,4 ± 11,0	6,98	164,2 ± 15,2	6,57	4,2 ± 0,1	0,17	4,3 ± 0,2	0,17
Ho-trienol		110						41,5 ± 1,1	0,38	38,5 ± 2,7	0,35	nd	--	nd	--
α-terpineol	pinho, lilás	330		Nd	--	3,8 ± 1,3	0,01	62,6 ± 9,3	0,19	81,9 ± 28,6	0,25	1,7 ± 0,1	0,01	2,1 ± 0,1	0,01
citronelol	floral, citrinos	18		Nd	--	7,7 ± 0,3	0,43	2,4 ± 0,1	0,13	6,5 ± 1,3	0,36	1,9 ± 0,3	0,10	2,0 ± 0,0	0,11
nerol		400						4,6 ± 0,3	0,01	8,0 ± 4,0	0,02	nd	--	nd	--
geraniol		36						nd	--	21,5 ± 3,0	0,60	nd	--	nd	--
total				9,0		22,5		285,5		320,6		7,8		8,4	
Óxidos e dióis monoterpénicos															
óxido furânico de linalol, <i>trans</i> -		6000						3,4 ± 0,1	0,00	4,5 ± 0,6	0,00	nd	--	nd	--
óxido furânico de linalol, <i>cis</i> -		6000						7,8 ± 1,3	0,00	8,4 ± 0,2	0,00	nd	--	nd	--
óxido pirânico de linalol, <i>trans</i> -		3000						15,0 ± 0,7	0,01	17,0 ± 0,7	0,01	nd	--	nd	--
óxido pirânico de linalol, <i>cis</i> -		3000						3,6 ± 0,2	0,00	4,5 ± 0,5	0,00	nd	--	nd	--
3,7-dimetilocta-1,5-dieno-3,7-diol								15,9 ± 1,6		18,7 ± 0,8		nd	--	nd	--
hidrato de linalol								nd	--	1,7 ± 0,4		nd	--	nd	--
3,7-dimetilocta-1,7-dieno-3,6-diol								nd	--	3,2 ± 0,2		nd	--	nd	--
total								45,6		58,1		nd		nd	

Tabela V-3: Continuação.

			Mistura de Loureiro e Avesso 2010				Loureiro 2011				Batoca 2011			
Descritor aromático ^a	L.O. ^a (µg/L)	Lalvin QA23®		D3		Lalvin QA23®		D3		Lalvin QA23®		D3		
		C/(µg/L)	O.A.V.	C/(µg/L)	O.A.V.	C/(µg/L)	O.A.V.	C/(µg/L)	O.A.V.	C/(µg/L)	O.A.V.	C/(µg/L)	O.A.V.	
C13-norisoprenoides														
3-hidroxi-β-damascona	chá e tabaco	Nd	--	2,2 ± 0,5		2,3 ± 0,4		3,3 ± 1,0		1,5 ± 0,3		1,8 ± 0,1		
3-oxo-α-ionol	tabaco	10,1 ± 1,4		12,7 ± 0,4		2,0 ± 0,1		2,6 ± 0,5		nd	--	1,3 ± 0,3		
total		10,1		14,9		4,3		5,9		1,5		3,1		
Fenóis voláteis														
4-vinilguaiacol	fenólico, cravo, fumo	130	128,5 ± 4,9	0,99	139,2 ± 10,2	1,07	101,7 ± 5,9	0,78	87,1 ± 9,4	0,67	26,9 ± 2,8	0,21	28,9 ± 5,1	0,22
4-vinilfenol	estramônio, casca de amêndoa	180	68 ± 1,3	0,38	84 ± 6,3	0,47	25,5 ± 1,5	0,14	32,7 ± 6,2	0,18	nd	--	nd	--
vanilato de metilo	baunilha	3000	5,3 ± 0,5	0,00	5,1 ± 0,4	0,00	nd	--	nd	--	nd	--	nd	--
álcool 3,4,5-trimetoxibenzílico							2,0 ± 0,1		2,8 ± 0,2		nd	--	nd	--
acetovanilona	baunilha	1000	13 ± 0,7	0,01	27,4 ± 2,4	0,03	2,8 ± 0,1	0,00	4,3 ± 0,2	0,00	6,5 ± 1,1	0,01	8,0 ± 1,5	0,01
total			214,8		255,7		132,0		126,9		33,3		36,9	
Ácidos gordos voláteis														
ácido isobutírico	gordura	173	21 ± 0,7	0,12	39,3 ± 0,4	0,23	12,5 ± 0,6	0,07	29,1 ± 2,7	0,17	11,5 ± 1,6	0,07	20,6 ± 4,0	0,12
ácido butanóico	gordura	170	75,7 ± 2,7	0,45	122,3 ± 11,9	0,72	109,5 ± 5,6	0,64	8,2 ± 0,4	0,05	nd	--	nd	--
ácido isovalérico	gordura, ranço	33	34,2 ± 18,9	1,04	62,9 ± 1,5	1,91	28,9 ± 1,1	0,88	43,7 ± 4,4	1,32	34,9 ± 5,5	1,06	27,3 ± 4,0	0,83
ácido hexanóico	gerânio, vegetal	420	1110,8 ± 37,9	2,64	1013 ± 48,7	2,41	1480,5 ± 126,9	3,53	1093,4 ± 99,3	2,60	612,1 ± 97,4	1,46	560,8 ± 74,9	1,34
ácido E-2-hexenoico	frutado, queijo, gordura		12,5 ± 3,4		17,6 ± 4,1		3,3 ± 0,3		nd	--	nd	--	nd	--
ácido octanóico	bode, gordura	500	4605,6 ± 49,7	9,21	3577,5 ± 283,5	7,16	4967,9 ± 51,6	9,94	3898,5 ± 66,2	7,80	2792,7 ± 219,4	5,59	2523,1 ± 142,9	5,05
ácido decanóico	cera, sebo, sabão	1000	1993,2 ± 60,0	1,99	1186,9 ± 60,6	1,19	1709,7 ± 185,6	1,71	1073,7 ± 118,3	1,07	902,5 ± 52,3	0,90	671,2 ± 48,9	0,67
ácido dodecanóico							6,8 ± 0,2		4,6 ± 0,4		nd	--	nd	--
total			7853,0		6019,5		8319,1		6151,1		4353,7		3803,0	
Compostos carbonilados														
2-furaldeído	amêndoa, madeira, doce		3,5 ± 0,5		nd	--								
benzaldeído	frutado, amargo, cereja	2000	21,8 ± 3,3	0,01	22,8 ± 5									

Tabela V-3: Continuação.

Descritor aromático ^a	L.O. ^a (µg/L)	Mistura de Loureiro e Aveso 2010				Loureiro 2011				Batoca 2011			
		Lalvin QA23®		D3		Lalvin QA23®		D3		Lalvin QA23®		D3	
		C/(µg/L)	O.A.V.	C/(µg/L)	O.A.V.	C/(µg/L)	O.A.V.	C/(µg/L)	O.A.V.	C/(µg/L)	O.A.V.	C/(µg/L)	O.A.V.
Compostos carbonilados (cont.)													
2-nonanona						nd	--	nd	--	1,7 ± 0,3		nd	--
total		29,8		22,8									
Outros													
2-metil-tetrahidrotiofeno-3-ona		40,1 ± 3,6		46,8 ± 5,1		11,4 ± 0,6		12,0 ± 0,9		20,5 ± 0,8		23,3 ± 1,1	
pantolactona frutado		Nd --		4,3 ± 0,5		2,4 ± 0,8		3,7 ± 0,7		2,3 ± 0,5		3,5 ± 0,7	
N-(2-fenil)acetamida		26,1 ± 3,4		24,5 ± 1,1		11,2 ± 0,4		18,7 ± 2,0		18,8 ± 2,6		2,9 ± 0,9	
total		66,2		75,6		25,0		34,4		41,7		29,7	

nd – não detetado.

^a (Aznar et al., 2003; Etievant, 1991; Ferreira et al., 2002, 2001; Francis and Newton, 2005; Gómez-Míguez et al., 2007; Guth, 1997; Li, 2006; Meilgaard, 1975; Oliveira et al., 2009; Ribéreau-Gayon et al., 2000; Simpson, 1979; Yong-Sheng Tao and Li, 2009)

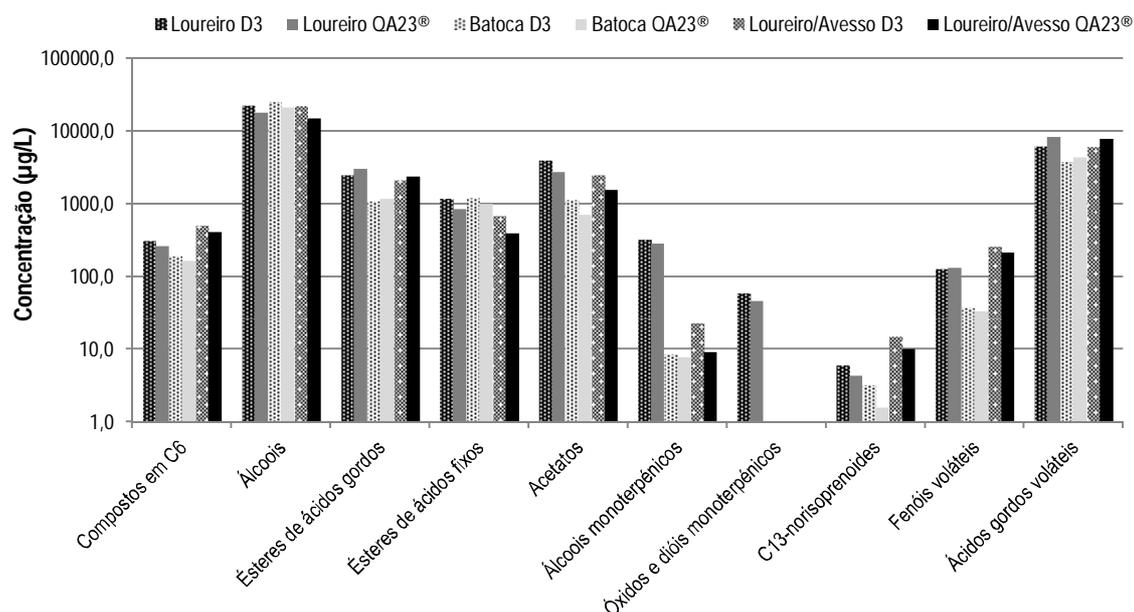


Figura V-6: Concentração total dos compostos do aroma identificados em cada família, para os vinhos obtidos pela fermentação com as estirpes Lalvin QA23® e D3, dos mostos das castas *Loureiro* (2011), *Batoca* (2011), e mistura de *Loureiro* e *Avesso* (2010).

Com o propósito de avaliar o impacto dos compostos analisados no aroma geral dos vinhos, determinou-se o valor da atividade de odor (O.A.V.) dividindo a concentração de cada composto pelo seu limiar de percepção olfativa. Os compostos com valor de O.A.V. superior a um têm impacto no aroma (Guth, 1997). Dos 71 compostos analisados, 21% têm O.A.V. superior a um, mas não foi possível determinar o O.A.V. em 32% dos compostos, uma vez que não foram encontrados na literatura os respetivos valores do limiar de percepção. Dos compostos com O.A.V. superior a um destaca-se o 9-decenoato de etilo (descriptor de aroma frutado), que apenas apresentou teores superiores ao limiar de percepção nos vinhos produzidos com a estirpe D3. Relativamente aos outros compostos com impacto no aroma, as diferenças observadas entre os vinhos das mesmas castas obtidos com as duas estirpes em paralelo, são mais quantitativas do que qualitativas. Os vinhos resultantes da fermentação com a estirpe D3 também obtiveram o dobro do valor de O.A.V. para os compostos 2 e 3-metil-1-butanol (descriptor de banana) e para o acetato de isoamilol (descriptor de banana e maçã), relativamente aos vinhos produzidos com a estirpe comercial. Os valores mais elevados de O.A.V. foram obtidos na família dos ésteres de ácidos gordos, nomeadamente o octanoato de etilo (descriptor doce e conhaque de damasco). De resto, foi neste grupo, que confere aromas frutados e florais aos vinhos, que se verificou um

maior número de compostos com concentrações superiores ao limiar de percepção (butirato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo e 9-decanoato de etilo). Contudo, na sua maioria, foram os vinhos produzidos com a estirpe comercial que evidenciaram teores mais abundantes. Alguns descritores negativos relativos a compostos pertencentes ao grupo dos ácidos gordos voláteis também tiveram valores de O.A.V. superiores a um (ácido hexanóico, ácido octanóico, ácido decanóico e ácido isovalérico), e os teores mais elevados observaram-se maioritariamente nos vinhos produzidos com a estirpe comercial. De acordo com as castas, observaram-se ainda teores superiores ao limiar de percepção em diferentes compostos, nomeadamente o linalol na casta *Loureiro*, o acetato de 2-feniletilo na mistura de castas de *Loureiro* e *Avesso* e o 2-feniletanol na casta *Batoça*. As concentrações de linalol e de acetato de 2-feniletilo foram ligeiramente superiores nos vinhos obtidos com a Lalvin QA23[®] enquanto a concentração de 2-feniletanol foi levemente superior no vinho produzido com a D3.

Nos vinhos produzidos com a estirpe selecionada D3, embora apenas um tenha sido avaliado por um painel de provadores, foram detetados aromas a frutos tropicais, em particular aroma a maracujá (em 2010, com as castas *Loureiro* e *Avesso* e em 2011, com a casta *Loureiro*), a lúchias (em 2011, com a casta *Alvarinho*) e a buxo e giesta (em 2011, com a casta *Sauvignon blanc*). Estes aromas sugerem a presença de tióis voláteis, pelo que foi realizada a análise dos três compostos mais importantes (4MMP, 3AMH, 3MH). Os vinhos escolhidos para esta determinação foram os da casta *Loureiro*, fermentados em 2011, com a estirpe D3 em paralelo com a Lalvin QA23[®] (Tabela V-4). Os dois vinhos apresentaram valores superiores ao limiar de percepção olfativa do composto 4MMP. No entanto, relativamente ao composto 3AMH, apenas no vinho obtido com a estirpe D3 se verificou uma concentração superior ao limiar de percepção. O vinho produzido com a estirpe D3 evidenciou concentrações superiores para os três tióis analisados, 44% (4MMP), 148% (3AMH) e 67% (3MH), comparativamente ao vinho produzido com a comercial Lalvin QA23[®].

Tabela V- 4: Concentração de tióis voláteis nos vinhos obtidos pela fermentação do mosto da casta *Loureiro* (2011) com as estirpes Lalvin QA23[®] e D3, seus descritores aromáticos e limiar de percepção olfativa.

	4MMP (ng/L)	3MHA (ng/L)	3MH (ng/L)
Descritores aromáticos ^{a,b}	Buxo, giesta	Buxo, maracujá, toranja	Toranja, maracujá
Limiar de percepção olfativa ^a	0,8	4	60
D3	16,4	7,2	46,1
QA23 [®]	11,4	2,9	27,6

^a Em solução hidro alcoólica, 12 %(v/v) (Tominaga et al., 1998b); ^b (Dubourdieu et al., 2006)

Nestes dois vinhos foram ainda determinados os valores de 2,3-butanodiol através do método descrito por Peinado (2004) ligeiramente modificado, e observou-se que os valores obtidos com a estirpe D3 foram superiores em 30% relativamente aos valores obtidos com a estirpe comercial Lalvin QA23® (resultados não apresentados).

Na Figura V-7 estão representados os perfis sensoriais dos vinhos produzidos em 2010. A avaliação foi realizada por um painel de 34 provadores, treinados e não treinados, de modo a conhecer as preferências do consumidor comum, e de acordo com os critérios especificados anteriormente (2.7).

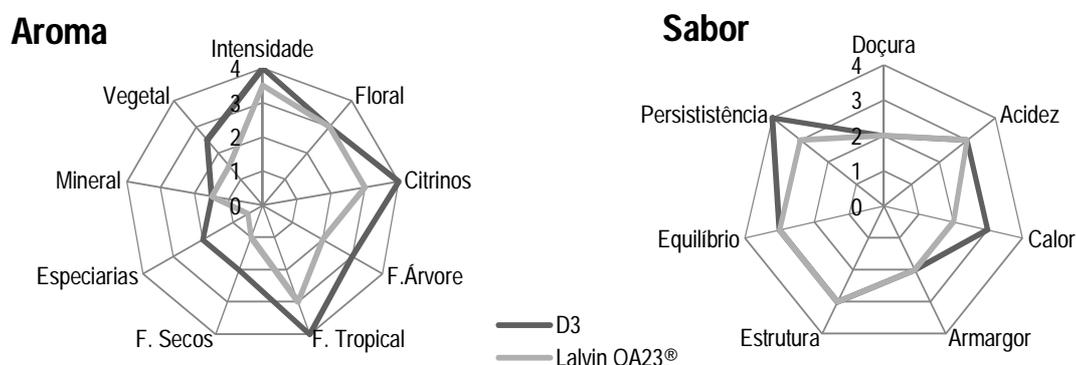


Figura V-7: Análise sensorial dos vinhos obtidos pela fermentação do mosto de 2010, constituído pela mistura das castas *Loureiro* e *Avesso*, com a estirpe D3 em comparação com a Lalvin QA23®.

A análise sensorial indicou que ambos os vinhos são equilibrados, têm estrutura e acidez, mas o vinho produzido com a estirpe D3 é mais persistente e transmite uma maior sensação de calor. Em relação ao aroma, embora tenham sido identificados os descritores florais e frutados nos dois vinhos, o produzido com a estirpe D3 evidenciou uma maior intensidade, nomeadamente de frutos tropicais e citrinos.

Os vinhos produzidos em 2011 oxidaram e refermentaram em garrafa devido ao facto de não se ter adicionado dióxido de enxofre na fase do engarrafamento. Em consequência deste imprevisto, os resultados da análise sensorial a estes vinhos foram descartados. No entanto, foi possível realizar as análises aos compostos do aroma, uma vez que as amostras recolhidas para o efeito foram preservadas por congelamento.

4 DISCUSSÃO

Os testes à escala laboratorial para a avaliação das principais características enológicas são essenciais na seleção de novas estirpes vínicas, que envolve geralmente um grande número de estirpes. Contudo, os testes em pequena escala não reproduzem com exatidão as fermentações à escala industrial (Cadière et al., 2012) e após a seleção de leveduras, fundamentada em ensaios preliminares realizados em laboratório, é necessário realizar ensaios à escala piloto ou industrial. Estes ensaios devem ser realizados com mostos de castas específicas, nas condições tecnológicas geralmente utilizadas nos processos industriais (temperatura, concentração de SO₂, etc) e monitorizados através de análises químicas e sensoriais dos produtos finais de forma a comprovar o efeito da estirpe nos vinhos resultantes. Deve ainda ser avaliada a capacidade da estirpe para dominar a flora indígena presente as fermentações à escala industrial.

A avaliação do potencial enológico da estirpe D3 para vinificações industriais foi efetuada comparando o seu comportamento fermentativo à escala piloto e industrial com uma levedura comercial de referência (Lalvin QA23[®]), verificando a sua capacidade de implantação em diferentes mostos de castas de uvas brancas e tintas e em diferentes condições de vinificação, e analisando os metabolitos primários e os compostos voláteis do aroma produzidos.

A capacidade de implantação das leveduras selecionadas em fermentações industriais e a sua influência na qualidade final do vinho é uma das últimas características a ser avaliada nos programas de seleção (Lopes et al., 2007b). Diversos trabalhos têm evidenciado que o domínio da estirpe inoculada não está sempre garantido tendo sido apontadas várias causas relacionadas com a diversidade e quantidade da flora indígena como a forte competição (Barrajón et al., 2009; Beltran et al., 2002; Capece et al., 2010b) e a proporção da concentração celular (Delteil, 2004; Lopes et al., 2007b), entre as leveduras indígenas e as inoculadas. Inclusivamente, nem as leveduras *killer* dominam sempre no final da fermentação, a sua implantação também depende da proporção do número inicial de células relativamente ao das outras estirpes, mesmo nas condições ótimas de crescimento (Heard and Fleet, 1987). Existem ainda outras razões que influenciam a implantação das leveduras inoculadas, que estão relacionadas com as condições de vinificação e características do inóculo (Capítulo V, 1). Neste trabalho, a análise das sequências interdelta dos isolados de levedura recolhidos no final de cada fermentação permitiu verificar que todas as fermentações realizadas em 2011, realizadas em diversos mostos e em diferentes condições, foram dominadas pelas estirpes inoculadas inicialmente (Figura V-2). Delteil (2004) sugeriu que a implantação pode ser considerada efetiva

quando mais de 80% dos isolados pertencem à levedura que foi inoculada. Deste modo, podemos concluir que a implantação das estirpes foi efetiva, tanto nas fermentações com a levedura comercial Lalvin QA23[®] como com a D3, uma vez que 100% dos isolados recolhidos mostraram o mesmo padrão genético. Esta elevada taxa de implantação pode indiciar que as estirpes possuem fenótipo *killer*. As informações disponibilizadas pelo fabricante da levedura comercial classificam-na como *killer*. Relativamente à estirpe D3, os resultados obtidos no Capítulo IV classificaram-na como neutra. Assim, embora a estirpe D3 não tenha fenótipo *killer*, ambas as leveduras são resistentes à toxina K2. De sublinhar que já em 2010 se tinha confirmado a implantação efetiva nas fermentações realizadas com as duas estirpes em paralelo, em 50 L de mosto *Loureiro* e *Avesso*, realizadas na Universidade do Minho. Este resultado demonstrou que a estirpe D3 consegue implantar-se em mostos de diversas castas de uvas brancas e tintas, provenientes de diferentes vinhas e em diferentes anos vitícolas, e fermentados numa gama de temperaturas de 16 a 25 °C.

Foram realizadas fermentações em diferentes volumes da casta *Loureiro* e com a estirpe D3 de modo a avaliar o impacto do aumento da escala no comportamento da fermentação. O perfil fermentativo foi semelhante nas vinificações que decorreram a 18 °C, e as mais rápidas foram as conduzidas num volume maior (Figura V-3, A). Embora as realizadas nos volumes de 5 e 50 L tenham terminado ao mesmo tempo, comparando os valores de açúcares residuais verificou-se que no volume de 50 L a concentração de açúcares é menor, o que significa que no mesmo intervalo de tempo esta fermentação foi ligeiramente mais eficaz. Esta observação é confirmada pelos resultados do rendimento em etanol que foram ligeiramente superiores nas fermentações de maior escala (Tabela V-2). Embora o desfasamento do tempo de fermentação observado possa resultar também da diferença de metodologia na monitorização (perda de massa no volume de 0,1 L, e densidade nos volumes de 5 e 50 L), os resultados dos rendimentos em etanol e em glicerol observados confirmam o pior desempenho da fermentação de menor volume (0,1 L). Outros estudos de comparação de escalas já realizados reportaram que as fermentações à escala piloto foram ligeiramente mais lentas do que as à escala laboratorial e que não se verificaram diferenças significativas nos principais produtos da fermentação, como o etanol e o glicerol (Casalta et al., 2010b; Rossouw et al., 2012b). Contudo, como nas nossas fermentações à escala laboratorial o valor de ácido acético foi atipicamente elevado (2,9 g/L), suspeita-se que ocorreu alguma contaminação que pode ter provocado desvios nos resultados. Contudo, por motivos operacionais, não nos foi possível comprovar esta hipótese. Relativamente à fermentação de 500 L, esta foi mais lenta devido ao facto de ter sido

conduzida à temperatura de 16 °C. Como referido anteriormente, esta diferença nas condições de fermentação foi assumida de modo a possibilitar a comparação dos resultados das análises químicas com os do vinho obtido com a levedura comercial. No que diz respeito aos principais produtos da fermentação, o etanol, o glicerol, o ácido málico, o ácido acético e o ácido succínico, as concentrações obtidas nos volumes de 5, 50 e 500 L foram análogas. Ainda assim, e apesar das diferenças observadas nas diferentes escalas, as fermentações à escala laboratorial forneceram informações que nos permitem realizar uma pré-seleção das leveduras. Todavia, os resultados obtidos, nomeadamente o tempo de fermentação e o rendimento em etanol, reforçam a necessidade de numa última fase realizar ensaios à escala piloto e industrial com as leveduras selecionadas.

A estirpe D3 fermentou nas condições de vinificação utilizadas na EVAG, que são representativas das práticas geralmente utilizadas nas adegas. A duração das fermentações das castas de uvas tintas (4 a 7 dias) e de uvas brancas (7 a 14 dias) tiveram tempos semelhantes aos habitualmente observados na EVAG. Comparando com outros estudos de testes à escala piloto (Callejon et al., 2010; Lopes et al., 2007b; Rossouw et al., 2012b), a duração das fermentações foram mesmo mais curtas.

No que diz respeito às concentrações dos compostos resultantes do metabolismo primário destaca-se o facto de os vinhos produzidos com a estirpe D3 conterem teores de glicerol entre 5,8 e 13,11 g/L, que são superiores aos valores médios normalmente observados que se encontram entre 5 e 9 g/L (Noble and Bursick, 1984). Quantitativamente, o glicerol é o subproduto mais abundante da fermentação, depois do etanol e do dióxido de carbono, e contribui para a suavidade, estrutura e corpo do vinho (Lambrechts and Pretorius, 2000; OIV, 2012; Scanes et al., 1998). Assim, embora dependa do estilo de vinho, são desejáveis elevadas quantidades de glicerol, pelo que na seleção de leveduras o rendimento da produção de glicerol é um dos critérios mais importantes (OIV, 2012; Yalcin and Ozbas, 2008). Todos os vinhos produzidos com a estirpe D3 apresentaram teores em glicerol superiores ao limiar de perceção deste composto no sabor, que é 5,2 g/L (Noble and Bursick, 1984). Nas fermentações que decorreram em paralelo com a estirpe comercial, a estirpe D3 mostrou um rendimento da produção de glicerol superior, à temperatura de 18 °C. Para além da estirpe e da quantidade de inóculo, existem vários fatores ambientais que influenciam o metabolismo das leveduras na produção de glicerol como o arejamento, a temperatura de fermentação, a concentração inicial de açúcar, as fontes de azoto na composição dos mostos, o SO₂ e o pH, a casta e a maturação das uvas, bem como a infeção das uvas com *Botrytis cinerea* (Du et al., 2011; OIV, 2012; Radler

and Schutz, 1982; Rankine and Bridson, 1971; Ribéreau-Gayon et al., 2006; Scanes et al., 1998; Yalcin and Ozbas, 2008). Um estudo realizado com 19 leveduras vínicas comerciais concluiu que a variabilidade da concentração de glicerol é influenciada predominantemente pela estirpe, enquanto os fatores ambientais têm um efeito menor (Remize et al., 2000). No trabalho aqui reportado, as fermentações que decorreram em paralelo com as duas estirpes foram realizadas em condições ambientais muito semelhantes, pelo que as diferenças observadas nos teores de glicerol de deveram às estirpes utilizadas. Nos outros ensaios realizados com a estirpe D3, as diferenças observadas ocorreram em consequência da variação das seguintes condições ambientais: a casta, e consequentemente distintas concentrações de açúcar e fontes de azoto; a temperatura de fermentação, principalmente a usada nas castas de uvas tintas e de uvas brancas; e o volume da vasilha de fermentação. Tipicamente, em condições de fermentação controladas, as concentrações de glicerol são mais elevadas nos vinhos de castas tintas (Mattick and Rice, 1970; Nieuwoudt et al., 2002; Rankine and Bridson, 1971). Nas castas testadas, também os vinhos das castas tintas apresentaram valores de glicerol mais elevados, à exceção da casta *Syrah* que obteve uma concentração ligeiramente inferior a duas castas de uvas brancas (*Alvarinho* e *Sauvignon blanc*). Curiosamente, num trabalho que comparou a concentração de glicerol de 237 vinhos tintos da África do Sul, o valor médio mais baixo pertenceu precisamente à casta *Syrah*, mas devido à complexidade de fatores que influenciam os teores deste composto, não foi possível estabelecer uma relação entre os níveis de glicerol e as castas (Nieuwoudt et al., 2002). A análise dos resultados do rendimento de glicerol (Tabela V-2) mostrou que os vinhos das castas tintas têm um rendimento superior ao das castas brancas, ou seja, 0,052 a 0,064 e 0,032 a 0,051, respetivamente. Este resultado justifica o facto de, mesmo partindo de concentrações de açúcar inferiores a algumas castas brancas (caso das castas *Touriga nacional* e *Cabernet sauvignon*), os vinhos das castas tintas consigam produzir teores de glicerol superiores. No entanto, analisando isoladamente as castas de uvas brancas e as castas de uvas tintas (à exceção da *Syrah*), verifica-se que os valores de glicerol mais elevados foram obtidos nas castas com maiores concentrações de açúcar inicial. Os resultados obtidos à escala piloto confirmaram que a estirpe D3 produz níveis de glicerol superiores aos valores médios normalmente observados, e superiores aos da estirpe comercial que foi utilizada como referência (a 18 °C).

O teor em etanol afeta as propriedades sensoriais do vinho, conferindo uma sensação de calor, corpo e viscosidade, e um menor efeito na doçura, acidez e intensidade do aroma (Gawel et al., 2007; Ugliano and Henschke, 2009). Relativamente a este composto, principal

produto da fermentação, obtiveram-se valores entre 8,2 e 13,5% (v/v), nos vinhos das castas *Gewurztraminer* e *Alvarinho*, respetivamente. O teor de etanol no vinho resulta principalmente da concentração inicial de açúcar no mosto, e os resultados obtidos neste trabalho, na generalidade, refletem este princípio. No entanto, como a maioria das fermentações foram terminadas antes do consumo total de açúcar, observaram-se algumas exceções. Assim, apesar da concentração inicial de açúcar nos mostos de outras castas (*Merlot* e *Sauvignon blanc*) ter sido superiores à do *Alvarinho*, os valores de açúcar residual (maioritariamente frutose) e de glicerol também são superiores, o que pode justificar os níveis de etanol ligeiramente inferiores.

A estirpe D3 revelou ter melhor rendimento na produção de etanol e glicerol a 18 °C, comparativamente à estirpe comercial usada como referência. No entanto, a 16 °C, a estirpe comercial apresentou um melhor desempenho que a D3.

A acidez volátil tem como principal composto o ácido acético e de acordo com a legislação europeia o valor máximo aceitável é de 1,2 g/L (Reg. (CE) nº 606/2009, Anexo I C- 1 b). O limiar de perceção para o ácido acético depende da casta e do estilo de vinho e varia de 0,7 a 1,1 g/L (Lambrechts and Pretorius, 2000), sendo que a teores de 0,9 g/L conferem um travo ácido e amargo ao vinho (Ribéreau-Gayon et al., 2006). À exceção dos ensaios à escala laboratorial realizados na EVAG, todos os vinhos apresentaram concentrações de ácido acético mais baixas que o limite inferior de perceção sensorial (0,7 g/L).

A análise aos compostos voláteis do aroma, nos vinhos de três castas de uvas brancas (*Loureiro*, *Batoca* e mistura de *Loureiro* e *Avesso*) obtidos da fermentação em paralelo com as duas estirpes, revelaram que a estirpe D3 contribuiu para teores mais elevados de compostos em C6, de álcoois superiores, de ésteres etílicos de ácidos fixos, de acetatos, de álcoois monoterpénicos, de óxidos e dióis monoterpénicos, de C13-norisoprenóides e de fenóis voláteis, enquanto a estirpe Lalvin QA23® os contribuiu para concentrações superiores de ésteres de ácidos gordos e ácidos gordos voláteis (Figura V-6). Os valores de O.A.V. revelaram que a generalidade dos compostos que tiveram um maior contributo para o aroma foram os que têm origem no metabolismo da levedura, ou seja, foram compostos que pertencem às classes químicas de álcoois superiores, de ésteres de ácidos gordos, de acetatos e de ácidos gordos voláteis. À exceção do 9-decenoato de etilo, as diferenças observadas nos compostos voláteis presentes nos vinhos das mesmas castas fermentados em paralelo com as duas estirpes, foram mais quantitativas do que qualitativas, o que também foi observado noutros estudos (Callejon et al., 2010; Romano et al., 2003). O éster 9-decenoato de etilo é produzido durante a fermentação

e resulta da reação do etanol com um ácido gordo (o ácido 9-decenóico), cuja formação depende dos metabolismos do azoto e lipídico da levedura. Este éster, que confere um aroma frutado, foi apenas quantificado em teores superiores ao limiar de percepção olfativa nos vinhos produzidos com a estirpe D3. Este resultado, que foi observado nas três castas analisadas, pode indicar que esta é uma característica metabólica da estirpe D3, uma vez que nas três fermentações que decorreram em paralelo com a levedura comercial a concentração do 9-decenoato de etilo foi cerca de 6, 11 e 2 vezes menor (*Loureiro/Avesso*, *Loureiro* e *Batoca*). No entanto, a composição inicial do mosto tem influência na concentração final deste éster, como foi verificado com diferentes teores de azoto na casta *Grenache* (Novo et al., 2014). À semelhança de outros ésteres, a concentração do 9-decenoato de etilo diminui ao longo do tempo de armazenamento (Bordiga et al., 2014). Relativamente aos outros ésteres de ácidos gordos com teores superiores ao limiar de percepção, as diferenças observadas entre os vinhos produzidos com as duas estirpes foram menores, mas na generalidade as concentrações foram superiores nos vinhos produzidos com a Lalvin QA23[®]. Também a maioria dos ácidos gordos voláteis com O.A.V. superior a um, tiveram teores superiores nos vinhos produzidos com a estirpe comercial. Embora esteja descrito que este grupo contribui com aromas maioritariamente negativos (frutados, de queijo, de gordura e de ranço), é importante para o equilíbrio aromático do vinho (Oliveira, 2000; Ribéreau-Gayon et al., 2006). Relativamente aos compostos das outras famílias, também o 2 e 3-metil-1-butanol (descriptor de banana) e o acetato de isoamilo (descriptor de banana e maçã) tiveram teores superiores nos vinhos produzidos com a D3. Aliás, o acetato de isoamilo, no vinho de *Loureiro/Avesso*, teve o dobro da concentração comparativamente ao produzido com a levedura comercial. O outro acetato com O.A.V. superior a um, o acetato de 2-feniletano, que confere aroma a rosa, a mel e a tabaco, obteve teores ligeiramente superiores com a levedura comercial (*Loureiro/Avesso* e *Loureiro*). Por outro lado, o álcool 2-feniletanol (descriptor de rosa e adocicado) teve teores superiores com a levedura D3, sendo o O.A.V. superior a 1 no vinho da casta *Batoca*.

Os tióis voláteis são componentes importantes do aroma de vinhos produzidos com várias castas, em especial a casta *Sauvignon blanc*, mas também com *Scheurebe*, *Gewürztraminer*, *Riesling*, *Cabernet sauvignon*, *Merlot*, entre outras (Guth, 1997; Murat et al., 2001; Tominaga and Dubourdieu, 2000; Tominaga et al., 1998a). Os principais compostos são o 4-mercapto-4-metilpentano-2-ona (4MMP), o 3-mercaptohexano-1-ol (3MH) e o seu acetato o 3-mercaptohexilacetato (3MHA), e podem ter impacto significativo na qualidade do vinho e nas preferências do consumidor (Swiegers et al, 2007). Estes compostos estão praticamente

ausentes nas uvas e nos mostos, aparecendo apenas no decorrer da fermentação alcoólica devido à ação das leveduras na clivagem de precursores não odoríficos (Darriet et al., 1995; Oliveira, 2000). Embora ainda não se conheça exatamente os mecanismos de transformação dos precursores não aromáticos nos tióis voláteis 4MMP e 3MH, existem três vias que são aceites como explicação para a sua ocorrência nos vinhos (Coetzee and du Toit, 2012; Roland et al., 2011). A primeira via envolve os precursores cisteinilados (Cys4MMP e Cys3MH) que são clivados pela levedura através da sua atividade β -liase (Tominaga et al., 1998a). A segunda via é o mecanismo de libertação dos tióis a partir dos precursores glutationilados (G4MMP e G3MH), mas até ao momento esta via só foi estudada para um dos precursores glutationilados, o G3MH, que é mais abundante nas uvas do que o G4MMP (Roland et al., 2011). Parece que o G3MH pode ter dois papéis, de acordo com as condições enológicas: ser um pró-precursor da Cys3MH (Gachons et al., 2002; Thibon et al., 2011) e precursor do 3MH (Grant-Preece et al., 2010; Roland et al., 2010). A última via envolve os compostos insaturados em C6, como por exemplo o (E)-2-hexenal, que passa por uma adição de enxofre durante a fermentação alcoólica (Schneider et al., 2006). O composto 3MHA é um caso particular, uma vez que é formado pelas leveduras através da acetilação do 3MH, pela ação da enzima álcool acetil transferase (Swiegers et al., 2007).

Como o nível da atividade da β -liase varia de estirpe para estirpe, a seleção de leveduras pode ser utilizada, em parte, para controlar teor de tióis polifuncionais no vinho (Dubourdieu et al., 2006; Roncoroni et al., 2011; Swiegers and Pretorius, 2007). Também a capacidade de converter o 3MH em 3MHA é dependente da estirpe de levedura que realiza a fermentação (Swiegers et al., 2005). Os resultados da concentração de tióis voláteis (Tabela V-4), nos vinhos da casta *Loureiro* produzidos com as duas estirpes em paralelo, mostraram níveis superiores dos três tióis analisados no vinho produzido com a estirpe D3. Esta observação sugere que a estirpe D3 teve uma maior capacidade para libertar os compostos 4MMP e 3MH dos seus precursores e para converter o 3MH em 3MHA do que estirpe comercial Lalvin QA23[®]. Um estudo que utilizou várias leveduras comerciais para fermentar um mosto de *Sauvignon blanc*, revelou que a Lalvin QA23[®], embora pouco eficiente na libertação do 3MH, foi a estirpe que possuía a maior capacidade para converter o 3MH em 3MHA (Swiegers et al., 2009). Embora sejam necessários testes adicionais de modo a confirmar esta hipótese, os resultados obtidos com a estirpe D3 indiciam que esta levedura pode ser utilizada para aumentar os teores de tióis voláteis nos vinhos.

A análise sensorial indicou que o vinho produzido com a estirpe *S. cerevisiae* D3 tem um aroma frutado mais intenso, tem um sabor mais persistente e transmite uma maior sensação de calor. O perfil sensorial dos vinhos das castas *Loureiro* e *Avesso* é sustentado pela análise cromatográfica na medida em que o etanol e o glicerol contribuem para o calor e corpo do vinho, e os compostos das famílias de álcoois superiores, ésteres e acetatos, contribuem para as notas frutadas. Em relação aos ésteres destaca-se o 9-decenoato de etilo, que confere notas frutadas, e só no vinho produzido com a estirpe D3 se observou uma concentração duas vezes superior ao limiar de perceção e seis vezes superior ao teor verificado com a levedura comercial. Também as concentrações dos álcoois superiores 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol (descriptor álcool, banana e doce) e do acetato de isoamilo (descriptor de banana, maçã e solvente), que tiveram valores duas vezes e 65 vezes superiores ao limiar de perceção, contribuíram para as notas frutadas. Os seus teores também foram superiores aos observados no vinho produzido em paralelo com a levedura comercial. Embora nos vinhos produzidos em 2010 não tenham sido determinados os tióis voláteis, os resultados dos vinhos da casta *Loureiro* de 2011 demonstraram que o vinho produzido com a estirpe D3 tinha concentração de 4MMP e 3AMH muito superior ao limite de perceção. Assim, fazendo uma extrapolação para o vinho da mistura de *Loureiro* e *Avesso* de 2010 (D3), o aroma a frutos tropicais detetado na análise sensorial também deve resultar da maior concentração destes compostos no vinho produzido com a estirpe D3. A análise ao 2,3-butanodiol realizada nos vinhos da casta *Loureiro* de 2011 indicou que o vinho produzido com a estirpe D3 tinha um teor 30% superior ao vinho obtido com a levedura comercial, o que pode justificar a maior suavidade dos vinhos produzidos com esta estirpe.

Agradecimentos

Eugénia Vieira beneficiou de uma bolsa de doutoramento (Vinalia e FCT (SFRH / BDE / 33672/2009). Este estudo também foi financiado por fundos nacionais da Fundação para a Ciência e Tecnologia, projecto PTDC/AGR-ALI/103392/2008, e do Sétimo Programa-Quadro da Comunidade Europeia (FP7/2007-2013) sob o contrato n.º 232454 e ainda pelo POFC (Programa Operacional Factores de Competitividade)-COMPETE e fundos da FCT no âmbito do projecto PEst – C/BIA/UI4050/2011. Agradecemos à Comissão dos Vinhos Verdes a cedência das instalações e da matéria prima, e à Doutora Teresa Mota e ao Engenheiro Garrido por todo o apoio dado na EVAG.

CAPÍTULO VI

**LEVEDURAS “À LA CARTE”: CARACTERIZAÇÃO ENOLÓGICA DE
LEVEDURAS AUTÓCTONES DE SEIS REGIÕES VITIVINÍCOLAS
PORTUGUESAS.**

RESUMO

Neste estudo foi efetuada a caracterização da diversidade fenotípica e enológica do grupo de 64 estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, isoladas no final de fermentações espontâneas de mostos provenientes de seis regiões vitivinícolas, resultado do trabalho descrito no Capítulo IV. Pretendeu-se estimar se as populações de estirpes isoladas a partir de mostos pertencentes à mesma região vitivinícola partilhavam fenótipos similares e se as interações entre as leveduras e as condições ambientais favoreceram a ocorrência de estirpes mais adaptadas às condições vitivinícolas locais. Este trabalho enquadrou-se parcialmente nos objetivos previstos no projeto QREN SI I&DT-24718-MyeastStarter que visou avaliar o impacto das leveduras autóctones na qualidade dos vinhos produzidos a partir de mostos provenientes da mesma região vitivinícola. Desta forma, foi considerado um conjunto de características importantes para avaliar o potencial enológico das leveduras, nomeadamente a resistência ao SO₂, a tolerância ao etanol, o fenómeno *killer*, o potencial de produção de H₂S, a atividade da β-glucosidase e da utilização da galactose como fonte de carbono. Os resultados destes testes não apresentaram diferenças entre as populações das seis regiões vitivinícolas. A fermentação em mostos de *Loureiro* e *Avesso* e de *Touriga nacional*, provenientes de duas das regiões de origem das populações em estudo (Vinhos Verdes e Douro e Porto), permitiu comparar o desempenho fermentativo, assim como alguns metabolitos produzidos por cada população. Os resultados revelaram que as fermentações mais rápidas foram efetuadas pelas populações pertencentes à região de proveniência do mosto, o que apoia a hipótese de que estas estirpes estão mais adaptadas às características ecológicas e tecnológicas dos mostos da sua área de viticultura. Com exceção da concentração de glicérol, que apresentou valores superiores na população do Dão-Lafões em ambos os mostos, as concentrações dos restantes metabolitos analisados foram diversas, o que sugere que as estirpes utilizaram diferentes estratégias metabólicas para responder aos condicionalismos ambientais, independentemente da sua região de origem.

1 INTRODUÇÃO

As leveduras são provavelmente o grupo mais importante entre os microrganismos fermentativos (Sicard and Legras, 2011), sendo a espécie *Saccharomyces cerevisiae* a principal responsável pela fermentação alcoólica e mais utilizada atualmente na indústria alimentar. Até ao momento, foram isoladas inúmeras estirpes de *S. cerevisiae* em todo o mundo a partir de diferentes origens, mas associadas essencialmente a dois habitats distintos: em fermentações relacionadas com atividades humanas (vinho, cerveja, pão, sidra, saké, etc.) e em diferentes nichos naturais (solo, carvalhos, frutos, insetos, etc.).

As evidências mais antigas da produção de bebidas fermentadas datam do período neolítico, quando foram domesticadas as primeiras plantas e animais, que forneceram a base para sociedades mais complexas e para a fixação permanente das populações (McGovern et al., 2009). A longa história de utilização de *S. cerevisiae* em fermentações relacionadas com atividades humanas suportou a hipótese de domesticação desta espécie. A análise de genómica comparativa de estirpes de *S. cerevisiae* isoladas em diferentes continentes e a partir de diversos nichos ecológicos revelou que as estirpes associadas à produção de bebidas alcoólicas derivam de populações presentes em nichos naturais, existindo a evidência de dois eventos principais de domesticação, um correspondente a estirpes vínicas e outro a estirpes utilizadas na produção de sake (Fay and Benavides, 2005). A comparação dos polimorfismos existentes numa colecção de 63 estirpes de *S. cerevisiae* sustentou a hipótese de eventos de domesticação independentes (grupo de estirpes vínicas, do sake e de laboratório), não sendo a espécie *S. cerevisiae* domesticada “como um todo” (Schacherer et al., 2009), mas compreendendo populações designadas como “domesticadas” e “selvagens”. Após os eventos de domesticação desta espécie, as tecnologias da fermentação e as populações de leveduras associadas acompanharam os seres humanos nos seus fluxos migratórios, promovendo a sua disseminação por diferentes regiões geográficas (Legras et al., 2007; Sicard and Legras, 2011).

Presume-se que a tecnologia da vinificação se expandiu da Mesopotâmia para o resto do mundo associada à “domesticação” da vinha (Legras et al., 2007; Pretorius, 2000). Na Europa a expansão ocorreu ao longo do mar do Mediterrâneo e através do vale do Danúbio (Legras et al., 2007). Na península Ibérica supõe-se que a vinha terá sido cultivada pela primeira vez pelos Tartessos, em 2000 a. C. (IVV, n.d.). No século X a.C., os Fenícios apoderaram-se do comércio do vinho e pensa-se que introduziram novas castas na região. Os gregos instalaram-se na península Ibérica no século VII a.C. e, para além da sua participação na evolução da viticultura, contribuíram principalmente para o desenvolvimento das técnicas de produção do vinho. Os

Celtas também trouxeram novas castas para Península (século VI a.C.), mas foi com a presença dos romanos (século II a.C.) que a cultura da vinha teve um progresso considerável, com a introdução de novas variedades e com o aperfeiçoamento de certas técnicas de cultivo, designadamente a poda. Com a fundação de Portugal, em 1143, o vinho manteve a sua importância, constituindo mesmo o principal produto exportado entre os séculos XII e XIII. Na segunda metade do século XIV observou-se um desenvolvimento da produção de vinho e um grande aumento das exportações, que continuou até à altura dos Descobrimentos (séculos XV e XVI). As exportações voltaram a aumentar após o tratado de Methuen (1703) que estabeleceu condições especiais para o comércio entre Portugal e Inglaterra. Em 1756 foi criada a região do Alto Douro, que segundo alguns investigadores foi a primeira região demarcada oficialmente no mundo vitivinícola, de modo a proteger a qualidade do afamado vinho do Porto. No princípio do século XX foram demarcadas várias regiões vinícolas e em 1986 as regiões vinícolas foram redefinidas, e novas foram criadas, depois da adesão de Portugal à Comunidade Europeia (IVV, n.d.). Atualmente, existem em Portugal catorze regiões vitivinícolas demarcadas, detentoras de características geoclimáticas distintas (Tabela VI-1), e onde são cultivadas castas bem adaptadas a essas regiões (IVV, n.d.). Em Portugal está oficialmente autorizado o cultivo de 341 castas (Almadanim et al., 2007), sendo que destas, cerca de 250 são castas autóctones (IVV, 2013). Esta diversidade de castas, associada às particularidades do solo e do clima das diferentes regiões, permitem a produção de vinhos muito diversificados e com diferentes tipicidades.

A qualidade de um vinho está particularmente relacionada com as várias espécies e estirpes de leveduras que realizam a fermentação alcoólica, na medida em que metabolizam os constituintes do mosto numa vasta gama de compostos que contribuem para o seu aroma e sabor (Romano et al., 2003; Styger et al., 2011). Nas fermentações naturais ou espontâneas dominam inicialmente as leveduras não-*Saccharomyces*, em geral espécies pertencentes aos géneros *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), *Candida*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Issatchenkia* e *Kluyveromyces*, que entram em declínio a partir do meio da fermentação e são ultrapassadas pelo crescimento das leveduras do género *Saccharomyces* (predominantemente da espécie *S. cerevisiae*), que terminam a fermentação (Fleet, 2008).

Tabela VI-1: Características geoclimáticas e principais castas portuguesas recomendadas das regiões vitivinícolas portuguesas (Infovini, n.d.; IVV, n.d.; Wines of Portugal, n.d.).

Regiões	Solos	Clima	Castas portuguesas recomendadas
Vinhos Verdes	Homogéneos e maioritariamente graníticos, férteis e de acidez elevada.	Influência atlântica extremada com temperaturas frescas e chuvas abundantes.	Branças: <i>Alvarinho, Arinto, Avesso, Azal, Loureiro e Trajadura</i> Tintas: <i>Borraçal, Brancelho, Espadeiro e Vinhão</i>
Trás-os-Montes	Graníticos, com algumas manchas de xisto, muito pobres e pouco produtivos.	Continental rigoroso, apresentando verões longos e escaldantes, seguidos por invernos prolongados e gélidos.	Branças: <i>Côdega do Larinho, Fernão Pires, Gouveio, Malvasia Fina, Rabigato, Síria e Viosinho</i> Tintas: <i>Bastardo, Marufo, Tinta Roriz, Touriga Franca, Touriga Nacional e Trincadeira</i>
Porto e Douro	As vinhas estão implantadas em socalcos espalhados pelas encostas íngremes do vale do rio Douro, onde os solos são xistosos e pobres.	Habitualmente seco, com invernos frios e verões muito quentes, variando entre a precipitação moderada a oeste e a secura nas terras próximas à fronteira.	Branças: <i>Gouveio, Malvasia Fina, Moscatel, Rabigato e Viosinho</i> Tintas: <i>Tinta Barroca, Tinta Roriz (Aragonês), Tinto Cão, Touriga Franca, Touriga Nacional, Sousão e Tinta Amarela (Trincadeira)</i>
Távora-Varosa	Graníticos, com algumas manchas de xisto. Vinhas cultivadas num vale encaixado a elevada altitude.	Extremo e de forte influência continental.	Branças: <i>Bical, Cerceal, Fernão Pires, Gouveio e Malvasia Fina</i> Tintas: <i>Tinta Barroca, Tinta Roriz (Aragonês), Touriga Franca e Touriga Nacional</i>
Bairrada	Região litoral e plana, divide-se entre terrenos argilo-calcários e faixas arenosas.	Marcada influência atlântica, com chuvas abundantes e temperaturas médias suaves.	Branças: <i>Fernão Pires (Maria Gomes), Arinto, Bical, Cercial e Rabo de Ovelha</i> Tintas: <i>Baga, Alfrocheiro, Tinta Pinheira e Touriga Nacional</i>
Dão-Lafões	Região circundada por montanhas em todas as direcções, assente em solos graníticos muito pobres.	As montanhas abrigam as vinhas da influência directa do clima continental e da influência marítima.	Branças: <i>Encruzado, Bical, Cercial, Malvasia Fina, Rabo de Ovelha e Verdelho</i> Tintas: <i>Touriga Nacional, Alfrocheiro, Jaen e Tinta Roriz</i>
Beira interior	Maioritariamente graníticos com pequenas manchas de xisto e, embora pouco comuns, manchas arenosas.	Influência continental extremada, com variações de temperatura significativas, verões curtos, quentes e secos, e invernos prolongados e muito frios.	Branças: <i>Arinto, Fonte Cal, Malvasia Fina, Rabo de Ovelha e Síria</i> Tintas: <i>Bastardo, Marufo, Rufete, Tinta Roriz e Touriga Nacional</i>
Lisboa	Dividem-se entre zonas argilo-calcárias e argilo-arenosas.	As vinhas implantadas junto ao litoral sofrem de uma forte influência atlântica, enquanto as vinhas estabelecidas no interior, protegidas da influência marítima pelos diversos sistemas montanhosos, beneficiam de um clima mediterrânico de transição.	Branças: <i>Arinto, Fernão Pires, Malvasia, Seara-Nova e Vital</i> Tintas: <i>Alicante Bouschet, Aragonês, Castelão, Tinta Miúda, Touriga Franca, Touriga Nacional e Trincadeira</i>

Tabela VI-1: Continuação.

Regiões	Solos	Clima	Castas portuguesas recomendadas
Tejo	Subdividem-se em três cadastros distintos: <i>campo</i> , <i>lezíria</i> ou <i>borda-d'água</i> , mais fértil e próxima ao rio; <i>charneca</i> , com solos arenosos pobres e <i>bairro</i> , com encostas mais íngremes e solos argilo-calcários.	Zona de transição climática, de forte influência mediterrânica acompanhada por uma ascendência mais atlântica ou mais continental, consoante a latitude e orografia.	Branças: <i>Arinto</i> , <i>Fernão Pires</i> , <i>Tália</i> , <i>Trincadeira das Pratas</i> e <i>Vital</i> , Tintas: <i>Castelão</i> , <i>Trincadeira</i> , <i>Aragonês</i> e <i>Touriga Nacional</i>
Península de Setúbal	Heterogéneos, alternando entre as areias finas e profundas das planícies e os solos calcários e argilo-calcários da Serra da Arrábida.	O clima da região é claramente mediterrânico, com verões quentes e secos, invernos amenos mas chuvosos, com humidade elevada. Só a Serra da Arrábida, pela altitude elevada e pela proximidade ao mar, beneficia de um clima de influência mais atlântica.	Branças: <i>Arinto</i> , <i>Fernão Pires</i> e <i>Moscatel de Alexandria</i> Tintas: <i>Alfrocheiro</i> , <i>Trincadeira</i> e <i>Castelão</i>
Alentejo	Alternam entre o xisto, argila, mármore, granito e calcário, numa diversidade pouco comum.	O clima é claramente mediterrânico, quente e seco, com forte influência continental.	Branças: <i>Antão Vaz</i> , <i>Arinto</i> e <i>Roupeiro</i> Tintas: <i>Alfrocheiro</i> , <i>Alicante Bouschet</i> , <i>Aragonês</i> , <i>Castelão</i> e <i>Trincadeira</i>
Algarve	Heterogéneos, dividindo-se por entre zonas de predominância arenosa, argilosa, calcária, grés e litólicos, com raras zonas xistosas nas encostas das serras.	A costa a leste de Faro, o Sotavento, é mais quente e de forte influência mediterrânica, e a costa a oeste de Faro, o Barlavento, é mais fresca, húmida e temperada.	Branças: <i>Arinto</i> , <i>Malvasia Fina</i> , <i>Manteúdo</i> e <i>Síria</i> Tintas: <i>Castelão</i> e <i>Negra Mole</i>
Açores	De origem vulcânica, são muito pobres.	A influência marítima está patente na precipitação elevada e nas temperaturas amenas ao longo de todo o ano.	Branças: <i>Arinto da Terceira</i> , <i>Boal</i> , <i>Fernão Pires</i> , <i>Terrantez do Pico</i> e <i>Verdelho dos Açores</i> .
Madeira	De origem vulcânica, férteis, ácidos e muito ricos em matéria orgânica.	Temperado e acentuadamente atlântico, com temperaturas amenas durante todo o ano.	Branças: <i>Cercial</i> , <i>Verdelho</i> , <i>Boal</i> e <i>Malvasia</i> Tintas: <i>Tinta Negra</i>

A fermentação espontânea permite a participação de várias estirpes autóctones que estão presentes na superfície das uvas, e que evoluíram durante muito tempo nas áreas de produção, presumindo-se que estas estirpes possam estar mais adaptadas às condições ambientais, para além de conferirem características que se identificam com a tipicidade de um vinho de um determinado local (Capece et al., 2011, 2010b; Esteve-Zarzoso et al., 2000; Nikolaou et al., 2006). As leveduras autóctones são o resultado de uma seleção natural que está correlacionada com diversos fatores tais como o ambiente (solo, clima, castas), as tradições locais, as práticas agrícolas e de vinificação (Capece et al., 2011). De facto, alguns autores evidenciam que diferentes regiões vitivinícolas são caracterizadas por uma grande diversidade de estirpes de leveduras, sugerindo a ocorrência de estirpes naturais específicas associadas ao *terroir* (Carreto et al., 2008; Lopes et al., 2002; Renouf and Strehaiano, 2006; Schuller et al., 2005; Tofalo et al., 2014; Valero et al., 2007). A avaliação da diversidade genética intra-específica de estirpes fermentativas associadas a vinhas mostrou que as populações de *S. cerevisiae* podem ocorrer localmente devido a influências multifactoriais, sendo a casta um desses fatores (Schuller et al., 2012). As leveduras dependem dos insectos como vetores para a sua dispersão (Goddard et al., 2010). Recentemente foram descobertos os detalhes moleculares da comunicação entre as leveduras *S. cerevisiae* e a mosca da fruta, que se baseia na atração da *Drosophila* pelo aroma produzido pelas leveduras (Christiaens et al., 2014). As vespas, para além de um vetor de dispersão, também podem funcionar como um reservatório natural de *S. cerevisiae* durante todas as estações do ano, desempenhando um papel importante na manutenção da diversidade ecológica e na conservação das populações de leveduras que evoluíram ao longo de séculos em ambientes de cultura da vinha e da produção de vinho (Stefanini, Dapporto, Legras, Calabretta, e Di, 2012).

Os microorganismos são capazes de responder às mudanças nas condições ambientais. No processo de vinificação, a matriz evolui rápida e continuamente, exercendo uma pressão ambiental que promove uma adaptação constante dos microorganismos (Divol et al., 2012). O mosto de uva tem propriedades muito desfavoráveis para a sobrevivência da maioria dos microrganismos, com pH entre 2,9 e 3,8 e elevada osmolaridade (200-300 g/L de açúcares), contudo as leveduras vínicas estão bem adaptadas a estas condições. O início da fermentação agrava as condições para a maioria dos organismos: o ambiente torna-se anaeróbio, as concentrações de etanol aumentam e alguns nutrientes são esgotados (Richter, Dunn, Sherlock, e Pugh, 2013). É neste ambiente hostil que a levedura *S. cerevisiae* se torna a espécie dominante na fermentação.

A espécie *S. cerevisiae* caracteriza-se pelo elevado potencial adaptativo a ambientes adversos (Carreto et al., 2011). As estirpes vínicas apresentam uma grande variedade de características fenotípicas, que são um reflexo da elevada diversidade genética, e que se correlacionam com a expressão de certos genes, com os níveis de certas proteínas e com a regulação metabólica (Rossouw et al., 2012a, 2010, 2009, 2008). Estudos de genómica comparativa revelaram os fatores genéticos que moldam a capacidade de adaptação de *S. cerevisiae* a diferentes ambientes e que definem as suas características fenotípicas. A elevada diversidade genómica entre estirpes de *S. cerevisiae* afeta diferentes níveis genéticos, desde a frequência e localização de polimorfismos nucleotídicos até à variabilidade no número de cópias de genes (Carreto et al., 2008; Liti et al., 2009; Schacherer et al., 2009). A evolução dos fenótipos é muitas vezes motivada por fatores ambientais e pelas interações entre cada organismo e o ambiente envolvente (Kvitek et al., 2008). A vinificação, devido às características do mosto e do processo fermentativo, envolve uma combinação de vários *stresses* ambientais (osmótico, ácido, etanol e de limitação de nutrientes) que acentuam as diferenças metabólicas entre as estirpes (Camarasa et al., 2011) uma vez que as vias metabólicas reagem a vários fatores. De facto, foi observada uma considerável variação fenotípica num estudo que envolveu um conjunto de 72 estirpes de *S. cerevisiae*, isoladas em diferentes nichos ambientais, que foram submetidas às condições de vinificação, sugerindo que esta espécie utiliza diversas estratégias metabólicas para enfrentar os constrangimentos ambientais (Camarasa et al., 2011).

Num trabalho anterior (Capítulo IV), foram isoladas 64 estirpes de *S. cerevisiae* em seis regiões vitivinícolas portuguesas (Alentejo, Bairrada, Dão, Porto e Douro, Tejo e Vinhos Verdes) que apresentam diferentes características edafoclimáticas. A recolha dos isolados de levedura foi efectuada no final de fermentações espontâneas realizadas com uvas pertencentes a castas recomendadas para cada uma das seis regiões. Os diferentes *habitats* de onde estas estirpes foram isoladas podem representar um conjunto de condições e *stresses* que possivelmente contribuíram para a emergência de fenótipos ou de características enológicas diferentes. Neste estudo pretendeu-se avaliar se esta variedade de *habitats* favoreceu a ocorrência de estirpes de *S. cerevisiae* mais adaptadas às condições vitivinícolas locais. Assim, foi analisada a diversidade fenotípica das 64 estirpes, determinando um conjunto de características importantes para avaliar o potencial enológico das leveduras, nomeadamente a resistência ao SO₂, a tolerância ao etanol, o fenómeno *killer*, o potencial de produção de H₂S, a atividade β-glucosidásica e a atividade galactosidásica. Por outro lado, avaliou-se o comportamento fermentativo e os principais metabolitos produzidos pelas 64 estirpes, em microfermentações realizadas nas mesmas

condições ambientais mas em dois mostos provenientes de duas das regiões vitivinícolas diferentes (Porto e Douro e Vinhos Verdes).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ESTIRPES DE LEVEDURAS

Neste trabalho foram usadas 64 estirpes de *S. cerevisiae*, anteriormente diferenciadas por análises de sequências interdelta a partir de isolados de levedura recolhidos em diferentes regiões vitivinícolas (Capítulo IV). Na Tabela VI-2 apresentam-se as designações das estirpes e as regiões vitivinícolas de onde foram isoladas.

Tabela VI-2: Designação das 64 estirpes de *S. cerevisiae*, regiões vitivinícolas e castas de onde foram isoladas.

Região Vitivinícola	Castas	Estirpes de <i>S. cerevisiae</i>
Vinhos Verdes	<i>Avesso</i>	C1, C2, C3, MC1, MC2
	<i>Loureiro</i>	LQ1, LQ2, LQ3, LQ4, LQ5
Bairrada	<i>Baga</i>	B1, B2, B3, B4, B5
Alentejo	<i>Aragonês</i>	AE1, AE2, AE3, AE4, AC1, AC2, AC3
Tejo	<i>Castelão</i>	RB1, RB3, RB4, RB5, RB6, RM1, RM2, RM3, RM4
Porto e Douro	<i>Aragonês</i>	DR1, DR2, DR3, DR4, DR5, DR6, DR7, DR8, DR9
	<i>Touriga Nacional</i>	D1, D2, D3, D4
Dão-Lafões	<i>Touriga Nacional</i>	Da1, Da2, Da3, Da4, Da5, Da6, Da7, Da8, Da9, Da10, Da11, Da12, Da13, Da14, Da15, Da16, Da17, Da18, Da19, Da20

A levedura comercial Lalvin QA23® (Lallemand) foi usada como referência. De forma a garantir que todas as estirpes tinham aproximadamente a mesma densidade celular, foram efetuados inóculos e procedeu-se ao acerto densidade óptica (D.O.). Para tal, a partir das estirpes armazenadas em glicerol (30%, v/v) a -80 °C, foram feitas culturas celulares em 50 mL de meio líquido YPD (1% extrato de levedura, p/v; 1% peptona, p/v; e 2% glucose, p/v) durante 48 h a 30 °C e 200 rpm. Após a leitura da D.O._{550 nm}, centrifugaram-se as culturas celulares (5 min, 2250 g/4000 rpm) e os sedimentos foram ressuspensos numa solução de glicerol a 30% (v/v), de modo a obter um valor de D.O._{550 nm} de 100,0. As culturas com as densidades celulares acertadas foram armazenadas em microplacas a -80 °C, contendo 100 µL de cada suspensão celular, até à realização das microfermentações.

2.2 TESTES FENOTÍPICOS

Foram realizados testes fenotípicos relevantes para a caracterização do potencial enológico das leveduras. De acordo os procedimentos anteriormente descritos (Capítulo IV, 2.3.1) testou-se a tolerância ao etanol, a resistência ao dióxido de enxofre (SO₂), o potencial da produção sulfureto de hidrogénio (H₂S), o fenómeno *killer* e a avaliação da atividade β-glucosidásica. A resistência ao sulfato de cobre (CuSO₄, 0,5 mM) e ao cloreto de sódio (NaCl, 3%, p/v) foi determinada em microplacas de 96 poços. Em cada poço inoculou-se 2 µL de suspensão celular (D.O._{620 nm} =1,0) em 100 µL meio YPD suplementado com os referidos compostos químicos. Os ensaios com as 64 estirpes foram efetuados em triplicado. Usou-se a concentração celular inicial de aproximadamente 2x10⁴ células/mL. Foi efetuada uma leitura das microplacas (D.O._{620 nm}) imediatamente a seguir ao inóculo e outra após 48 h de incubação a 30 °C. Para o tratamento dos resultados, foram consideradas apenas as estirpes com crescimentos superiores a 0,2. A capacidade de utilizar a galactose foi testada num meio seletivo contendo este açúcar como única fonte de carbono. Assim, ao meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB, Difco™), preparado de acordo com as instruções do fabricante, foi adicionada galactose (5%, p/v). Esta solução foi esterilizada por filtração (0,20 µm) e armazenada a 4 °C. As suspensões celulares das estirpes foram adicionadas a tubos contendo 5 mL de meio, de modo obter uma concentração celular inicial de 5x10⁵ células/mL. Após um período de incubação de 5 a 6 dias, a 26 °C, o crescimento foi avaliado visualmente, sendo considerados positivos os tubos que evidenciavam turvação e negativos os que se mantinham transparentes.

2.3 MICROFERMENTAÇÕES

As microfermentações foram realizadas em dois mostos: uvas de castas brancas provenientes da região dos Vinhos Verdes, constituído por uma mistura de *Loureiro* e *Avesso* na proporção aproximada de 50/50 % (v/v); e uvas da casta tinta *Touriga nacional*, procedente da região do Porto e Douro. O mosto de *Loureiro* e *Avesso* foi extraído a partir de uvas colhidas na vindima de 2010. O processamento do mosto envolveu a adição de 30 mg/L de metabissulfito de potássio e a clarificação a 4 °C durante 48 h, sendo posteriormente congelado (-20 °C) até à realização dos ensaios. Similarmente, na vindima de 2012, o mosto de *Touriga nacional* foi preparado de acordo com a prática utilizada na produção de vinhos de bica aberta e/ou “rosés”, ou seja, o sumo sem bagaço. De seguida adicionou-se metabissulfito de potássio (30 mg/L) e o mosto foi congelado (-20 °C) até à realização dos ensaios. As características dos mostos

utilizados (Tabela VI-3) foram determinadas nas instalações da YeastWine, por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), recorrendo ao equipamento Oenofoss™.

Tabela VI- 3: Composição dos mostos de *Touriga nacional* e *Loureiro* e *Avesso*, utilizados nas microfermentações.

	<i>Touriga nacional</i>	<i>Loureiro e Avesso</i>
Açúcares fermentescíveis % (p/v)	26,1	21,2
pH	4,1	3,6
Acidez Total (g/L)	1,6	6,2

Os mostos foram pré-filtrados com membranas de microfibras de vidro (Millipore), seguindo-se uma esterilização com membranas de porosidade 0,45 µm (Millipore). As microfermentações decorreram em balões Erlenmeyer estéreis de 100 mL, contendo o mesmo volume de mosto, tapados com rolhas previamente flamejadas que incluíam uma agulha estéril para permitir a libertação de CO₂. O inóculo de cada uma das culturas celulares foi efetuado de modo a obter uma concentração aproximada de 1x10⁶ células/mL, utilizando os inóculos preparados em 2.1. As microfermentações realizaram-se a 18 °C, com agitação de 70 rpm. A monitorização efetuou-se por pesagens diárias até cessar a produção de CO₂, o que foi evidente pelo valor constante da massa. As microfermentações que não terminaram em 50 dias foram descartadas.

2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS DOS VINHOS

As quantificações de frutose, de glucose, de etanol, de glicerol e de ácidos orgânicos (ácido acético, ácido succínico e ácido málico) nos vinhos resultantes das microfermentações dos mostos de *Touriga Nacional* e do lote de *Loureiro* e *Avesso*, efetuaram-se por HPLC conforme o procedimento anteriormente descrito (Capítulo IV, 2.3.3). O rendimento do etanol foi determinado pela fórmula $Y_{\text{etanol}} = \frac{g_{\text{etanol}}}{g_{\text{açúcar consumido}}}$.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

A análise estatística dos resultados dos parâmetros determinados nas microfermentações foi realizada utilizando o *software* do *Microsoft Excel 2010*[®]. Os resultados das fermentações de cada mosto foram agrupados tendo em conta a região de origem das estirpes de *S. cerevisiae* e determinaram-se as médias e os desvios padrão de cada grupo para cada parâmetro. Foi realizada a análise de variância *one-way* ANOVA dos seis grupos de estirpes (Alentejo, Douro e Porto, Vinhos Verdes, Bairrada, Tejo e Dão-Lafões) para cada parâmetro e para cada mosto, considerando-se as médias homogêneas quando *p*-valor > 0,05 e médias com diferenças significativas quando *p*-valor < 0,05. No teste de análise de variâncias

(ANOVA), quando se rejeita a hipótese de igualdade das médias, não temos informação sobre qual ou quais os grupos são responsáveis pela diferença. Assim, para esses casos, efetuaram-se adicionalmente comparações múltiplas entre todos os pares dos seis grupos utilizando o teste de Tukey-Kramer, com um nível de significância de 0,05.

3 RESULTADOS

No trabalho aqui reportado foram realizados testes fenotípicos e microvinificações, em dois mostos distintos, com 64 estirpes de *S. cerevisiae*. Estas estirpes foram isoladas no final de fermentações espontâneas de mostos obtidos a partir de diferentes castas recolhidas em seis regiões vitivinícolas (Alentejo, Douro, Vinhos Verdes, Bairrada, Tejo e Dão), no âmbito de trabalhos anteriores (Capítulo IV).

Na Figura VI-1 (A) encontram-se resumidos os resultados dos testes fenotípicos da tolerância a várias concentrações de etanol (12, 14, 16 e 18%, v/v) na presença de 50 mg/L de SO₂ e da resistência a diferentes concentrações de SO₂ (0, 75 e 100 mg/L) na presença de etanol a 12% (v/v), e na Figura VI-1 (B) os resultados do potencial da produção de H₂S, do fenómeno *killer*, da avaliação da atividade β-glucosidásica e do crescimento em galactose. Na Figura VI-1 apresentam-se os dados globais (em %) de estirpes de cada região que: apresentam crescimento (+) ou não crescimento (-) nos meios seletivos contendo etanol, SO₂ e galactose; que são *killer* (K), neutras (N) ou sensíveis (S) em relação às estirpes de referência CECT 1182 (K) e CECT 1415 (S); e que apresentam diferenças qualitativas no crescimento nos meios seletivos para avaliar a produção de H₂S e atividade β-glucosidásica. As classificações qualitativas utilizadas nestes dois últimos testes foram: sem produção/atividade, 0; baixa produção/atividade, 1; produção/atividade intermédia, 2, e produção/atividade elevada, 3.

Os resultados indicam que maioria das estirpes, na presença de 50 mg/L de SO₂, são tolerantes a 12 e 14% (v/v) de etanol (95 e 91% das estirpes, respetivamente), poucas (5%) são tolerantes a 16% (v/v) e nenhuma conseguiu crescer a 18% (v/v). Relativamente à resistência ao SO₂, a generalidade das estirpes (92%) conseguiu crescer com a maior concentração testada (100 mg/L), na presença de etanol a 12% (v/v), e obviamente o mesmo se observou para as concentrações inferiores (95% das estirpes nas concentrações de 50 e 75 mg/L). Todas as estirpes conseguiram crescer no controlo sem etanol e com 50 mg/L de SO₂ e 98% das estirpes cresceram no controlo com etanol a 12% (v/v) e sem SO₂. A comparação dos resultados dos controlos com os do crescimento com 12% (v/v) de etanol e 50 mg/L de SO₂, onde se observou

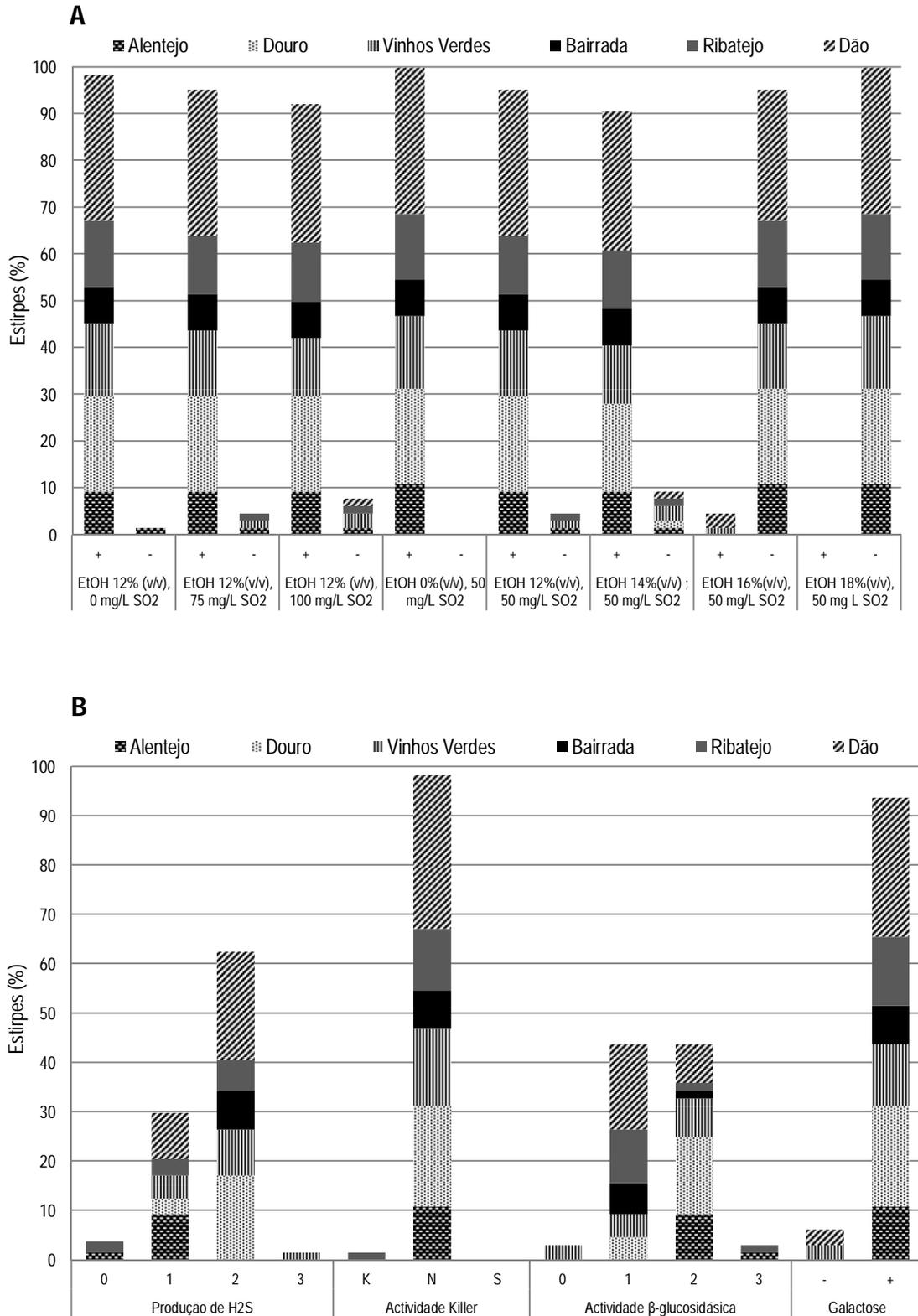


Figura VI-1: Resultados dos testes fenotípicos, representados como percentagem de estirpes de cada região vitivinícola que: **(A)** são resistentes a diferentes concentrações de etanol e SO₂ e **(B)** são produtoras de H₂S, têm fenótipo *killer*, atividade β-glucosidásica e atividade galactosidásica. As classificações qualitativas utilizadas nos testes de produção de H₂S e atividade β-glucosidásica foram: sem produção/atividade, 0; baixa produção/atividade, 1; produção/atividade intermédia, 2, e produção/atividade elevada, 3, respetivamente. Nos meios seletivos com etanol, SO₂ e galactose, os sinais (+) / (-) assinalam se houve ou não crescimento.

o crescimento de 95% das estirpes, revelou que 3% das estirpes são menos resistentes quando estes dois compostos estão presentes conjuntamente.

A maioria das estirpes (63%) apresenta um potencial de produção de H₂S médio, e o nível mais elevado observou-se apenas em 2% das estirpes, que foram isoladas na região dos Vinhos Verdes. Por outro lado, as estirpes que mostraram não ser produtoras de H₂S (4%), foram isoladas nas regiões do Alentejo e Tejo. De referir que as restantes estirpes isoladas no Alentejo apresentaram baixa produção de H₂S, correspondendo a um terço dos 30% das estirpes que apresentaram este nível de produção. À exceção das estirpes isoladas na região da Bairrada, que foram todas classificadas como produtoras intermédias, as isoladas nas outras regiões exibiram diferentes níveis de produção de H₂S. Relativamente ao fenótipo *killer*, observou-se que nenhuma das estirpes testadas foi sensível à toxina produzida pela estirpe de referência CECT 1182 (K) e apenas 2% das estirpes inibiram o crescimento da estirpe de referência CECT 1415 (S), sendo classificadas como *killer*. A quase totalidade das estirpes (98%) revelou-se neutra. No que diz respeito à atividade β-glicosidásica, observou-se a mesma percentagem de estirpes (44%) com atividade média e com atividade baixa, e a mesma percentagem de estirpes (3%) com atividade elevada e sem atividade. De salientar que todas as estirpes isoladas no Alentejo apresentam atividade β-glicosidásica média ou elevada, ou seja, os dois níveis com maior atividade. Por fim, verificou-se que 94% das estirpes consegue utilizar a galactose como fonte de carbono. Nestes resultados não se observou uma relação entre os fenótipos das estirpes e as suas regiões de origem.

Os resultados da resistência ao CuSO₄ (0,5 mM) e ao NaCl (3%, p/v) estão sumariados na Figura VI-2 (A) e (B), respetivamente. Nos gráficos apresentam-se os valores médios das densidades celulares, obtidos com as estirpes de cada região vitivinícola, cujo crescimento celular (D.O._{620 nm}) foi superior a 0,2. A análise da variância (one-way ANOVA) demonstrou que existe homogeneidade ($p > 0,05$) entre as médias obtidas com as estirpes de cada região, em ambos os testes. No entanto, apesar da semelhança das médias entre as regiões, salienta-se a desigualdade das percentagens de estirpes de cada região que conseguiram crescer nestas condições. Por exemplo, a percentagem de estirpes provenientes da região do Dão-Lafões que conseguiu crescer na presença de CuSO₄ (0,5 mM) e de NaCl (3%, p/v), foi muito inferior à observada com as estirpes das outras regiões.

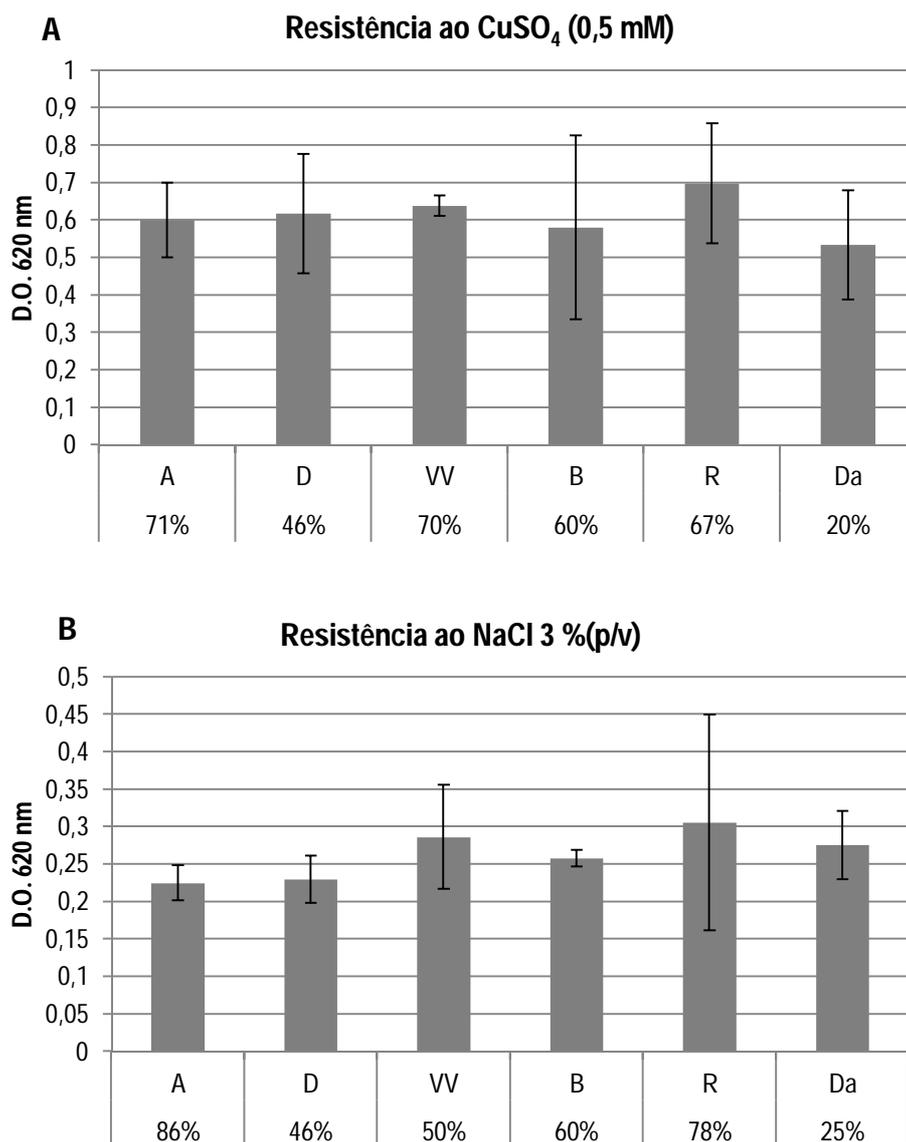


Figura VI-2: Resistência ao CuSO₄ a 0,5 mM **(A)** e ao NaCl a 3% (p/v) **(B)**, representadas como o valor médio da densidade celular, e respetivo desvio padrão, obtido com as estirpes de cada região vitivinícola em que se observou um crescimento superior a 0,2. Para cada uma das regiões A (Alentejo), D (Porto e Douro), VV (Vinhos Verdes), B (Bairrada), R (Tejo) e Da (Dão-Lafões) encontra-se indicada a percentagem de estirpes que conseguiu obter um crescimento superior a 0,2. As médias obtidas nas diferentes regiões (para os gráficos **A** e **B**) não têm diferenças estatísticas significativas entre elas (ANOVA, $p > 0,05$).

Foram avaliados alguns parâmetros de fermentação nomeadamente, tempo de fermentação e de latência (tempo até à perda de massa de 2 g/L), açúcares residuais no fim de fermentação (soma da glucose e da frutose), etanol produzido assim como o seu rendimento (Y_{etanol}), glicerol, e ácidos succínico, acético e málico. Na Figura VI-3. apresentam-se os valores médios destes parâmetros, obtidos com as estirpes de cada uma das seis regiões em microfermentações com dois mostos distintos (um de uma mistura de *Loureiro* e *Avesso* e outro

Loureiro e Avesso

Touriga nacional

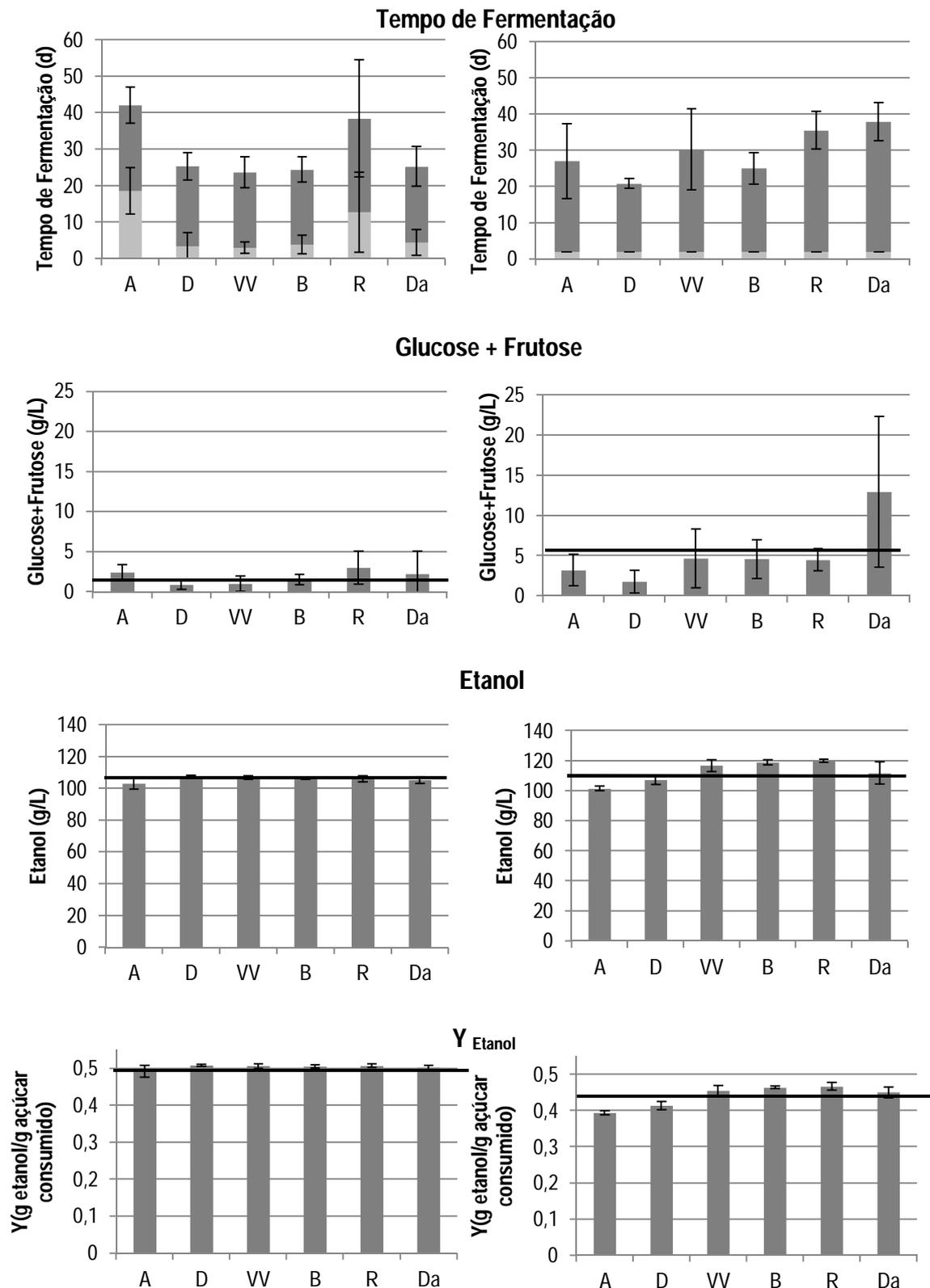


Figura VI- 3: Valores médios (e respetivos desvios padrão) dos tempos de fermentação e dos principais metabolitos obtidos nas microfermentações (18 °C) dos mostos de *Loureiro e Avesso* e de *Touriga Nacional*, com as estirpes *S. cerevisiae* isoladas nas regiões do Alentejo (A), Porto e Douro (D), Vinhos Verdes (VV), Bairrada (B), Tejo (R) e Dão-Lafões (Da). Nos gráficos do tempo de fermentação, a parte cinza claro das barras representa o tempo de latência. As linhas horizontais a negrito correspondem ao valor médio de todas as regiões.

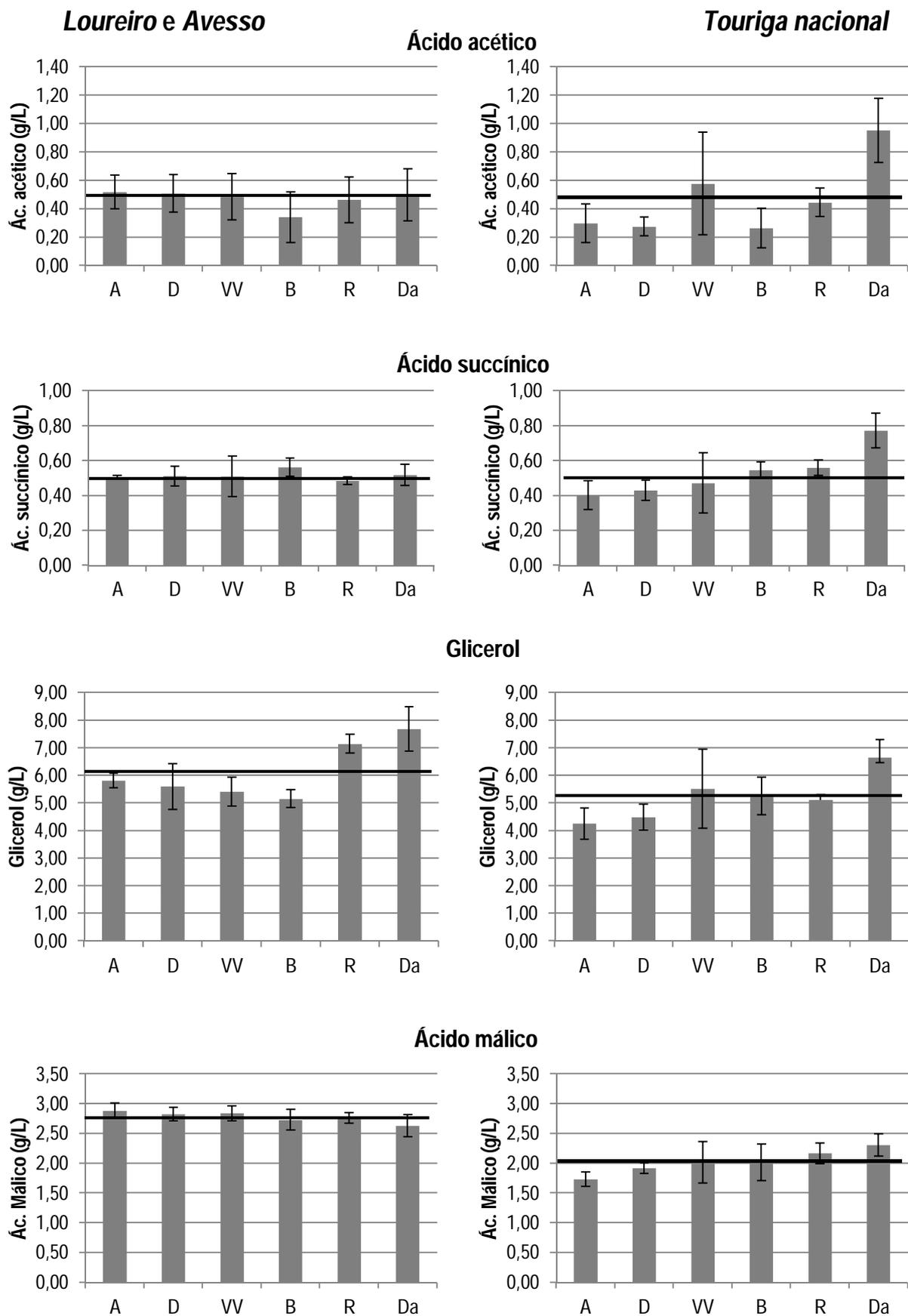


Figura VI-3: Continuação.

de *Touriga nacional*). A composição dos dois mostos encontram-se descritas na Tabela VI-3 (Materiais e Métodos). Embora usualmente as fermentações de mostos de castas de uvas tintas se realizem à temperatura ambiente, as microfermentações do mosto de *Touriga nacional* foram realizadas com temperatura controlada a 18 °C, de forma a reproduzir as condições de fermentação que foram utilizadas no mosto de *Loureiro* e *Avesso*.

Foi efetuada a análise da variância (*one-way* ANOVA) dos resultados de cada parâmetro de forma a avaliar se existem diferenças significativas entre os seis grupos de estirpes, cujos *p*-valor se encontram na Tabela VI-4. Esta análise revelou diferenças significativas ($p < 0,05$) em todos os parâmetros analisados nas microfermentações do mosto de *Touriga nacional* e nos parâmetros, tempo de fermentação e de latência, etanol e o seu rendimento (Y_{etanol}), glicerol, e ácido málico, nas microfermentações da mistura de *Loureiro* e *Avesso*. A análise ANOVA indica existirem diferenças entre as médias mas não mostra quais são diferentes entre si. Assim foram realizadas comparações múltiplas entre todos os pares de médias dos parâmetros com diferenças significativas utilizando o método de Tukey-Kramer (Tabela VI-4).

Tabela VI- 4: Resultados da análise da variância *one-way* ANOVA entre as seis regiões vitivinícolas (Alentejo-A, Porto e Douro -D, Vinhos Verdes-VV, Bairrada-B, Tejo-R e Dão-Da), para o tempo de fermentação e de latência e para os principais metabolitos obtidos nas microfermentações dos mostos de *Loureiro* e *Avesso* e de *Touriga Nacional*, e comparações múltiplas entre todos os pares de médias dos parâmetros com diferenças significativas (Tukey-Kramer).

	<i>Loureiro e Avesso</i>		<i>Touriga Nacional</i>	
	ANOVA (<i>p</i> -valor)	Tukey-Kramer *	ANOVA (<i>p</i> -valor)	Tukey-Kramer *
Tempo de fermentação	2,41E-03	A-D; A-VV; A-B; A-Da	8,04E-08	A-Da; D-VV; D-R; D-Da; B-Da
Tempo de latência	6,76E-05	A-D; A-VV; A-B; A-Da; D-R; VV-R; R-Da	-	-
Açúcares residuais	3,54E-01	-	8,09E-05	A-Da; D-Da; VV-Da
Etanol	5,98E-03	A-D; D-Da	1,39E-08	A-VV; A-B; A-R; A-Da; D-VV; D-B; D-R
Y_{etanol}	1,95E-03	A-D; A-VV; A-B; A-R; D-Da	5,27E-19	A-D; A-VV; A-B; A-R; A-Da; D-VV; D-B; D-R; D-Da
Glicerol	1,40E-10	A-Da; D-R; D-Da; VV-R; VV-Da; B-R; B-Da	1,37E-09	A-VV; A-Da; D-VV; D-Da; VV-Da; B-Da; R-Da
Ácido acético	5,20E-01	-	8,89E-11	A-Da; D-VV; D-R; D-Da; VV-Da; B-Da; R-Da
Ácido málico	1,12E-02	D-Da	5,76E-07	A-R; A-Da; D-R; D-Da; VV-Da
Ácido succínico	6,45E-01	-	3,35E-13	A-R; A-Da; D-R; D-Da; VV-Da; B-Da; R-Da

Diferenças significativas da variância assinaladas a negrito (p -valor < 0,05)

* Regiões vitivinícolas com médias estatisticamente diferentes entre si (Tukey-Kramer, $\alpha = 0,05$)

O tempo de fermentação do mosto de mistura de *Loureiro* e *Avesso* foi em média superior nos grupos de estirpes provenientes das regiões do Alentejo (42,0 d) e do Tejo (38,4 d),

mas nesta última o desvio padrão foi bastante elevado, reflexo de uma grande variabilidade dos resultados neste grupo. De facto, o teste de Tukey-Kramer mostrou que, à excepção da região do Tejo, a média do grupo do Alentejo foi significativamente diferente dos outros grupos. As médias das restantes regiões foram semelhantes, todavia o valor médio mais baixo (23,7 d) correspondeu ao grupo de estirpes isoladas na região dos Vinhos Verdes, a mesma região de origem do mosto utilizado nestas microfermentações. Estas diferenças também foram observadas para o tempo de latência, ou seja, valores médios superiores nos grupos do Alentejo (18,5 d) e Tejo (12,7 d) e menor valor médio no grupo dos Vinhos Verdes (3,0 d). Neste parâmetro, mantiveram-se as diferenças entre grupos que se observaram no tempo de fermentação e, adicionalmente, a média da região do Tejo foi estatisticamente diferente das médias do Douro e Porto, dos Vinhos Verdes e do Dão-Lafões. Em relação às fermentações do mosto de *Touriga nacional*, os tempos de fermentação com valores médios mais elevados pertenceram aos grupos de estirpes do Dão-Lafões (38 d) e do Tejo (36 d) e o valor médio mais baixo foi observado na região do Douro (21 d), que foi também a região de origem deste mosto.

O valor médio desta região apresentou diferenças significativas dos grupos dos Vinhos Verdes, do Dão-Lafões e do Tejo e semelhanças com as regiões do Alentejo e da Bairrada, que por sua vez também apresentaram diferenças com o grupo do Dão-Lafões (Tabela VI-4). O valor do tempo de latência destas microfermentações foi igual para todas as estirpes (2 d).

A percentagem de estirpes que conseguiu iniciar e conduzir as fermentações diferiu relativamente às castas de uvas do mosto, como se pode observar na Figura AIII-2 do Anexo III. A maioria das estirpes não teve dificuldade em fermentar o mosto de *Touriga nacional* enquanto 23% das estirpes não conseguiu iniciar a fermentação do mosto de *Loureiro* e *Avesso*. Contudo, como o mosto de *Touriga nacional* tinha uma elevada concentração de açúcares fermentescíveis (261 g/L), algumas estirpes apresentaram um fraco desempenho no final da fermentação, observando-se paragens de fermentação antes do consumo completo dos açúcares. De facto, a média global da concentração de açúcares residuais nas fermentações de *Touriga nacional* foi superior (5,23 g/L) relativamente à observada com o mosto de *Loureiro* e *Avesso* (1,82 g/L). No entanto, é de salientar que o menor valor médio das fermentações de *Touriga nacional* foi bastante inferior à média total, e pertenceu ao grupo do Douro (1,73 g/L), a região de proveniência deste mosto. O valor médio mais elevado foi bastante superior à média dos grupos e correspondeu ao grupo do Dão-Lafões (12,9 g/L), mas o seu desvio padrão foi bastante elevado. O teste de Tukey-Kramer confirmou que a média desta região foi significativamente diferente da média das regiões do Alentejo, Douro e Vinhos Verdes. Ainda no que diz respeito

aos açúcares residuais, as médias das regiões vitivinícolas foram homogêneas ($p > 0,05$) nas fermentações do mosto de *Loureiro* e *Avesso*. Relativamente à concentração de etanol, a média obtida nas fermentações do mosto de *Loureiro* e *Avesso* (105,76 g/L) foi inferior à obtida nas fermentações do mosto de *Touriga nacional* (112,61 g/L), como era expectável tendo em conta a concentração dos açúcares fermentescíveis (Tabela VI-3). Pela análise de variância verifica-se haver diferenças entre as fermentações nos dois mostos (Tabela VI-4). No caso do mosto de *Touriga nacional*, as regiões do Alentejo e do Douro e Porto tiveram a concentração média de etanol inferior à média total e ambas mostraram diferenças em relação às regiões dos Vinhos Verdes, da Bairrada e do Tejo, onde se observaram valores superiores. Em relação aos resultados com o mosto de *Loureiro* e *Avesso* apenas a região do Douro se distinguiu das regiões do Alentejo e do Dão. O rendimento em etanol (Y_{etanol}) apresentou uma média global superior nas fermentações com mosto *Loureiro* e *Avesso* (0,50) e a análise de variâncias encontrou diferenças significativas nas fermentações com os dois mostos, em consequência das diferenças encontradas nas concentrações de etanol e de açúcares residuais. No caso das fermentações do mosto de *Loureiro* e *Avesso* o menor rendimento correspondeu ao grupo do Alentejo (0,49), que foi significativamente diferente das regiões do Douro e Porto, dos Vinhos Verdes, da Bairrada e do Tejo. O maior rendimento correspondeu ao grupo do Douro e Porto (0,51) que se mostrou diferente da região do Dão-Lafões. O rendimento do grupo do Alentejo (0,39) também foi o menor nas fermentações do mosto de *Touriga nacional*, e o teste de Tukey-Kramer evidenciou diferenças com todas as outras regiões. Nestas fermentações a média da região do Douro e Porto (0,41) também foi inferior à média global (0,44) e diferente de todas as outras regiões.

A produção de glicerol foi superior nas fermentações do mosto de *Loureiro* e *Avesso* com uma concentração média global de 6,13 g/L. A análise de variâncias mostrou diferenças nos resultados dos dois mostos, e a concentração média mais elevada correspondeu à região do Dão-Lafões em ambos os casos, com valores de 6,6 e 7,7 g/L para o mosto de *Touriga nacional* e *Loureiro* e *Avesso*, respetivamente. Nas fermentações do mosto de *Touriga nacional*, para além da concentração média da região do Dão-Lafões, que foi estatisticamente diferente de todas as outras, também a região dos Vinhos Verdes teve uma concentração (5,5 g/L) superior à média global (5,2 g/L) e revelou-se estatisticamente diferente das regiões do Douro e Porto e do Alentejo. Relativamente às fermentações do mosto de *Loureiro* e *Avesso*, a média da região do Tejo (7,1 g/L) também foi superior à média global e não apresentou diferenças significativas da

região do Dão-Lafões. As duas regiões foram estatisticamente diferentes das regiões do Douro e Porto, dos Vinhos Verdes e da Bairrada.

A concentração média global de ácido acético e de ácido succínico nas fermentações dos dois mostos foram similares. A análise de variância destes dois parâmetros mostrou homogeneidade entre as médias das seis regiões nas fermentações do mosto de *Loureiro* e *Avesso*, ao contrário das do mosto de *Touriga nacional* que apresentaram diferenças estatísticas. O grupo da região do Dão-Lafões obteve os valores médios mais elevados destes dois ácidos, resultados que foram significativamente diferentes dos das outras regiões. No que diz respeito ao ácido acético, as regiões do Alentejo, da Bairrada e do Douro e Porto obtiveram valores inferiores à média global (0,47 g/L), e a média da região do Douro e Porto foi diferente das médias das regiões dos Vinhos Verdes e do Tejo. As médias da região do Alentejo e do Douro foram inferiores à média global do ácido succínico (0,53 g/L) e estatisticamente diferente da região do Tejo.

Relativamente ao ácido málico, a média global das fermentações do *Loureiro* e *Avesso* (2,78 g/L) foi ligeiramente maior que a das fermentações de *Touriga nacional* (2,02 g/L) e a análise de variâncias revelou diferenças estatísticas nos dois casos. Nas fermentações de *Touriga nacional* as concentrações das regiões do Dão-Lafões e do Tejo foram superiores à média global e estatisticamente diferentes das concentrações regiões do Alentejo e do Douro e Porto. Relativamente às fermentações do mosto de *Loureiro* e *Avesso*, a concentração da região do Dão-Lafões foi inferior à média global e estatisticamente diferente da concentração da região do Douro.

4 DISCUSSÃO

Nos últimos anos têm sido realizados estudos que reportam correlações entre algumas características fenotípicas de estirpes de *S. cerevisiae* e as suas aplicações tecnológicas: a resposta das estirpes produtoras de *sake* a vários *stresses* é consistente com a especialização do seu metabolismo para se desenvolverem nestas condições de fermentação (Kvitek et al., 2008); as estirpes utilizadas na panificação produzem menor quantidade de glicerol, de acetato e de succinato e as utilizadas em laboratório produzem concentrações elevadas de butirato de etilo (Camarasa et al., 2011). Também têm sido reportados fenótipos semelhantes entre estirpes provenientes dos mesmos nichos ecológicos: isolados de solo de carvalhais situados em zonas frias são mais resistentes ao congelamento-descongelamento, característica importante para a

sua sobrevivência no inverno (Kvitek et al., 2008); isolados de solos e de amostras clínicas são mais resistentes ao *stress* oxidativo (Diezmann and Dietrich, 2009); isolados das vinhas têm mais resistência ao sulfato de cobre, que pode resultar de uma adaptação adquirida pela utilização deste composto como fungicida (Fay et al., 2004; Kvitek et al., 2008).

No presente trabalho, com a caracterização da diversidade fenotípica e enológica de um grupo de 64 estirpes de *S. cerevisiae* pretendeu-se estimar i) se estirpes isoladas a partir de mostos pertencentes à mesma região vitivinícola partilham fenótipos similares e ii) se as interações entre as leveduras e as condições ambientais favorecem a ocorrência de estirpes mais adaptadas às condições vitivinícolas locais. As estirpes estudadas foram isoladas no final de fermentações espontâneas de mostos provenientes das regiões do Alentejo, do Douro e Porto, dos Vinhos Verdes, da Bairrada, do Tejo e do Dão-Lafões, ou seja, resistiram a combinações de diversos *stresses* ambientais durante o processo fermentativo, que podem ter variado em função da casta fermentada e da região de origem.

A fenotipagem foi efetuada recorrendo, maioritariamente, a testes habitualmente utilizados para a caracterização do potencial enológico das leveduras e mostrou a diversidade das populações de estirpes de cada região, à semelhança do verificado noutros estudos de caracterização populações de *S. cerevisiae*, particularmente nas estirpes isoladas em ambientes vitivinícolas (Camarasa et al., 2011; Csoma et al., 2010; Franco-Duarte et al., 2014; Kvitek et al., 2008; Mendes et al., 2013).

Os resultados relativos aos testes da tolerância ao etanol, da resistência ao SO₂, do fenómeno *killer*, da produção de H₂S, da atividade da β-glucosidase e da utilização da galactose como fonte de carbono não apresentaram diferenças entre as populações das seis regiões vitivinícolas (Figura VI-1 A e B). A tendência observada na população do Alentejo para produzir menos H₂S e ter maior atividade da β-glucosidase pode ser casual, sendo necessário avaliar um maior número de estirpes, e que sejam isoladas em diferentes anos vitícolas, para se poder afirmar que existe este padrão.

A fermentação de mostos das mesmas castas e provenientes das mesmas regiões de origem de duas das populações em estudo (Douro e Porto e Vinhos Verdes), permitiu obter informações sobre o comportamento fermentativo das seis populações de estirpes autóctones, assim como dos principais metabolitos produzidos. Com exceção da concentração média de glicerol que apresentou valores superiores na população do Dão-Lafões em ambos os mostos, as concentrações dos restantes metabolitos produzidos por cada população divergiram nas

fermentações dos dois mostos. Isto sugere que, pelo menos para os compostos analisados, as estirpes utilizaram diferentes estratégias metabólicas para responder aos condicionalismos ambientais independentemente da sua região de origem. Esta diversidade dos perfis metabólicos também foi observada em investigações semelhantes, que utilizaram mostos para fazer o estudo metabólico de populações de *S. cerevisiae* (Camarasa et al., 2011; Csoma et al., 2010).

No que respeita à resistência das estirpes ao sulfato de cobre, na concentração mais elevada utilizada no guia da OIV (OIV, 2012), e ao *stress* osmótico provocado pela presença de NaCl a 3% (p/v), não se observaram desempenhos estatisticamente diferentes entre as populações de estirpes das seis regiões que conseguiram crescer nestas condições. No entanto, apesar da homogeneidade das médias populacionais das estirpes que conseguiram crescer, a percentagem de estirpes de cada região que conseguiu desenvolver-se nestas condições de *stress* variou em ambos os testes, sendo a população do Dão-Lafões aquela onde se observou uma menor percentagem de estirpes resistentes. O cobre pode estar presente no mosto como consequência do uso do sulfato de cobre nas vinhas como fungicida, mas apesar dos efeitos tóxicos que as elevadas concentrações têm no crescimento das leveduras, algumas conseguem desenvolver mecanismos de defesa (OIV, 2012), existindo estudos que relatam a maior resistência ao sulfato de cobre por parte de estirpes isoladas em vinhas (Fay et al., 2004; Kvittek et al., 2008; Warringer et al., 2011b). Embora o teste da resistência ao *stress* osmótico provocado pela presença de NaCl, 3% (p/v), não seja utilizado habitualmente na avaliação do potencial enológico, é um parâmetro importante quando se pretende avaliar o potencial de aplicação de leveduras para a panificação. Por outro lado, algumas vinhas estão plantadas em solos mais salinos e absorvem os iões de sódio e de cloro por difusão passiva que, conseqüentemente, entram nos bagos de uva (Stevens and Walker, 2002). Quando as leveduras são inoculadas no mosto sofrem o *stress* osmótico devido ao elevado teor de açúcar e a presença de cloreto de sódio pode aumentar a osmolaridade do ambiente (Trainotti and Stambuk, 2001). Sabe-se que o mecanismo de defesa das leveduras ao *stress* salino se baseia no ajuste osmótico pela síntese de osmólitos e sistemas de transporte de catiões para exclusão do sódio. Os principais osmólitos produzidos pelas leveduras são os polióis, em particular o glicerol (Blomberg and Adler, 1992). Como já foi referido anteriormente, neste trabalho observou-se que apenas 25 % da população da região do Dão-Lafões consegue crescer na presença de 3% (p/v) de NaCl o que, comparativamente com as outras populações do estudo, evidencia uma maior sensibilidade osmótica desta população. Também já foi referido anteriormente que a população do Dão-Lafões produziu concentrações mais elevadas de glicerol nos dois mostos, e

este resultado poderá estar relacionado com a maior sensibilidade osmótica desta população que muito possivelmente inicia a reação ao *stress* em teores mais baixos. Adicionalmente à concentração de glicerol, na fermentação do mosto de *Touriga nacional* (que tinha concentração mais elevada de açúcares fermentescíveis) também se observou uma concentração mais elevada de ácido acético e um maior tempo de fermentação por parte da população do Dão-Lafões. Esta observação é concordante com a conclusão de um estudo australiano (Donkin et al., 2010) que avaliou o impacto do teor de sal no mosto (que tem vindo a aumentar devido ao aumento da salinidade dos solos) no desempenho das leveduras durante a fermentação, e que concluiu que aumenta o tempo de fermentação e são produzidas concentrações mais elevadas de glicerol e ácido acético.

No entanto, embora existam vários fatores ambientais que influenciam o metabolismo das leveduras na produção de glicerol (Du et al., 2011; OIV, 2012; Radler and Schutz, 1982; Rankine and Bridson, 1971; Ribéreau-Gayon et al., 2006; Scanes et al., 1998; Yalcin and Ozbas, 2008), um estudo que avaliou a produção de glicerol de 19 leveduras vínicas comerciais (Remize et al., 2000) concluiu que a variabilidade da concentração de glicerol é influenciada predominantemente pela estirpe, enquanto os fatores ambientais têm um menor efeito. Se tivermos em consideração este último estudo, os resultados relativos à população da região do Dão-Lafões indiciam que estas estirpes partilham esta característica de produzir teores mais elevados de glicerol.

Relativamente ao comportamento fermentativo das seis populações de estirpes nos dois mostos, os resultados revelaram que as fermentações mais rápidas foram efetuadas pelas populações pertencentes à mesma região de origem do mosto fermentado, o que apoia a hipótese de que estas estirpes estão melhor adaptadas às características ecológicas e tecnológicas dos mostos da sua área de viticultura. Relativamente ao mosto de *Loureiro* e *Avesso*, embora a população de estirpes dos Vinhos Verdes tenha obtido tempos médios de fermentação e de latência mais curtos, as regiões do Douro e Porto, da Bairrada e do Dão-Lafões tiveram um comportamento muito similar. No entanto as populações do Alentejo e do Tejo, regiões com mostos de características muito diferentes dos da região dos Vinhos Verdes, tiveram maior dificuldade na vinificação do mosto de *Loureiro* e *Avesso*, com longos tempos de latência e de fermentação e grande percentagem de fermentações amuadas (Anexo III). No que diz respeito ao mosto de *Touriga nacional*, evidenciou-se a maior capacidade da população do Douro e Porto para a fermentação deste mosto, apresentando diferenças significativas das populações do Dão-Lafões, do Tejo e dos Vinhos Verdes. De salientar que embora as estirpes

da região do Dão-Lafões tenham sido isoladas a partir de mosto da casta de uvas de *Touriga nacional*, a média do tempo de fermentação deste grupo de estirpes foi o mais elevado. Este resultado sugere que a região vitivinícola de origem do mosto tem maior impacto no desempenho das estirpes durante o processo fermentativo do que a casta de uvas que o constitui. Os diferentes desempenhos das populações de estirpes nos processos fermentativos refletiram-se nas concentrações de açúcares residuais. No caso do mosto de *Loureiro* e *Avesso* as concentrações foram homogéneas, mas relativamente ao mosto de *Touriga nacional* a dificuldade da população do Dão-Lafões em terminar as fermentações foi confirmada pela elevada concentração de açúcares residuais, contrariamente à região do Douro e Porto que teve a concentração mais baixa. O comportamento fermentativo observado neste trabalho reforça a hipótese de que as estirpes autóctones de uma região, por estarem mais adaptadas às condições ambientais vitivinícolas, têm uma maior capacidade para fermentar os mostos da sua região de origem. Estudos anteriores também observaram elevada influência da origem do isolamento das estirpes no desempenho da fermentação (Capece et al., 2012; Lopes et al., 2007a; Rodríguez et al., 2010; Romano et al., 2003).

Estes resultados indicam que é vantajoso utilizar leveduras de arranque obtidas em vinhas pertencentes à mesma região vitivinícola do mosto a fermentar, desde que tenham boas propriedades enológicas e sejam capazes de garantir a fermentação alcoólica durante todo o processo. Desta forma, programas de isolamento de leveduras autóctones das diferentes regiões vitivinícolas, que após a seleção de estirpes “à la carte” para cada produtor e/ou região, podem contribuir para a qualidade e diferenciação dos vinhos produzidos.

Agradecimentos

Eugénia Vieira beneficiou de uma bolsa de doutoramento (Vinalia e FCT (SFRH / BDE / 33672/2009). Este trabalho também foi financiado por fundos nacionais da Fundação para a Ciência e Tecnologia, projecto PTDC/AGR-ALI/103392/2008, e do Sétimo Programa-Quadro da Comunidade Europeia (FP7/2007-2013) sob o contrato n.º 232454 e ainda pelo POFC (Programa Operacional Factores de Competitividade)-COMPETE e fundos da FCT no âmbito do projecto PEst – C/BIA/UI4050/2011. Os resultados relativos à resistência ao sulfato de cobre e ao cloreto de sódio foram obtidos no âmbito do projeto QREN SI&DT – 24718 MyeastStrater e gentilmente cedidos pela empresa YeastWine.

CAPÍTULO VII

DISCUSSÃO GERAL E PERSPETIVAS DE TRABALHO

1 DISCUSSÃO GERAL E PERSPETIVAS DE TRABALHO

O principal objetivo deste doutoramento foi diversificar os produtos e serviços da empresa Vinalia. Recorrendo a aplicações do conhecimento atual em biotecnologia de leveduras, pretendeu-se disponibilizar ao setor vitivinícola, soluções direcionadas para a melhoria da qualidade do vinho. Estas envolveram o desenvolvimento de um método de alto débito para a extração de DNA de leveduras e a exploração da diversidade de estirpes com potencial enológico, isoladas em diferentes regiões vitivinícolas portuguesas, para aplicação na produção de vinhos típicos dessas regiões ou para a obtenção de novos produtos biotecnológicos.

A indústria vitivinícola recorre frequentemente ao uso de *starters* de levedura uma vez que estes asseguram o controlo microbiológico da fermentação e a qualidade do vinho produzido. Quando são utilizados os mesmos *starters* de levedura, esta prática garante também um certo grau de reprodutibilidade da qualidade do vinho entre campanhas vitivinícolas. Existem cerca de duas centenas de *starters* de levedura comercialmente disponíveis (Mendes et al., 2013), alguns com uma grande abrangência de utilização (independentes do tipo de vinho ou da casta). Tem sido defendido que a utilização quase universal destes *starters* generalistas tem contribuído para uma uniformização e descaracterização dos vinhos, razão pela qual os enólogos e produtores de vinho têm demonstrado maior interesse por leveduras que contribuam para a diferenciação dos seus produtos. Por forma a ir ao encontro das necessidades do mercado, justificou-se que uma das principais metas deste trabalho tenha sido a obtenção de novos recursos biológicos que contribuam para manter e melhorar as características diferenciadoras dos vinhos nacionais e internacionais.

A principal abordagem para a obtenção de novos *starters* para o mercado tem sido a exploração da diversidade de leveduras presentes nos ambientes vitivinícolas. Em geral, os estudos de diversidade inter- e intraespecífica analisam um grande número de isolados naturais de leveduras e o seu processamento requer métodos de análise de alto débito. A caracterização genética destes isolados envolve a extração de DNA, uma etapa que pode ser morosa. Assim, com o objetivo de isolar rapidamente o DNA de leveduras para a subsequente análise genotípica, desenvolveu-se um método simples, económico e de alto rendimento.

Tendo por base um num método previamente descrito (Lopez et al., 2001), foi otimizado e validado um método de isolamento de DNA num formato de microplaca de 96

poços. Este método envolve a disrupção enzimática da parede celular seguida de lise das células com um detergente, e subsequente precipitação de DNA com isopropanol e etanol. A concentração média de DNA obtida a partir de 12 estirpes *S. cerevisiae* e de outras 12 espécies de culturas crescidas em microplaca foi de 20 ng/μL e 50 ng/μL, respetivamente. Esta gama de concentrações permite a utilização direta do DNA nas ampliações por PCR (sem ajustes adicionais de concentração) para os métodos de análise de sequências interdelta, de *loci* de microssatélites e de regiões ITS ribossomais. O método otimizado permite processar 1536 amostras (16 microplacas) num dia de trabalho, o que se traduz num aumento de oito vezes relativamente ao método convencional. De acordo com a informação disponível *on-line*, este método miniaturizado é tão rápido como as soluções comerciais apresentadas em formato de microplacas e o seu custo é cerca de 50 vezes inferior.

A obtenção de estirpes com características enológicas particulares pode ser conseguida recorrendo à análise genotípica e fenotípica em larga escala de isolados naturais de leveduras, recolhidos no final de fermentações espontâneas de mostos de uvas selecionadas. Desta forma, em 2009, foram colhidas 66 amostras de uvas de diferentes castas (*Aragonês, Avesso, Baga, Castelão, Loureiro* e *Touriga Nacional*) pertencentes a seis regiões vitivinícolas portuguesas (Vinhos Verdes, do Dão, do Douro, da Bairrada, Tejo e do Alentejo). Após as fermentações espontâneas foram obtidos 1500 isolados de leveduras e a análise de sequências interdelta permitiu diferenciar 64 estirpes de *S. cerevisiae*.

Os programas de seleção de leveduras para aplicação enológica podem ser exaustivos devido ao elevado número de amostras e à diversidade de critérios envolvidos. Com o intuito de simplificar este processo foram testadas duas abordagens: por um lado foram comparados os resultados de estirpes obtidas a partir de dois tipos de amostras, não compostas (constituídas por mosto extraído de uvas provenientes do mesmo local de amostragem na vinha) e compostas (constituídas por volumes iguais de mostos obtidos a partir de uvas provenientes de diferentes locais da mesma vinha); por outro, testou-se um modelo de seleção de leveduras orientado segundo uma análise sequencial dos critérios enológicos, em que apenas as estirpes selecionadas na etapa anterior foram submetidas à análise dos critérios enológicos das etapas seguintes.

Os critérios enológicos envolveram testes fenotípicos qualitativos e microfermentações em mosto de *Loureiro* e *Avesso*. A sua análise seguiu a seguinte sequência: duração total da fermentação, perfil organolético, resistência ao sulfuroso (SO₂), tolerância ao etanol, fenómeno

killer, potencial de produção de sulfureto de hidrogênio (H₂S), atividade da β-glucosidase, e concentração dos principais metabolitos (etanol, glicerol e ácido acético) no final da fermentação assim como a concentração de açúcares residuais (glucose e frutose). Este processo de seleção iniciou-se com as 64 estirpes de *S. cerevisiae* e com a levedura comercial Lalvin QA23[®], que foi utilizada como referência. Das 64 estirpes, apenas 49 iniciaram a vinificação do mosto de *Loureiro* e *Avesso*. Destas, foram escolhidas as estirpes cuja duração da fermentação foi igual ou inferior à da estirpe de referência e que simultaneamente apresentaram apenas descritores aromáticos positivos, reduzindo o número de estirpes para 13. De seguida, os resultados dos testes fenotípicos restringiram para três o número de estirpes em análise. Finalmente, a interseção dos resultados da análise química (frutose, glucose, etanol, glicerol e ácido acético) aos vinhos obtidos com a duração da fermentação e análise organoléptica, permitiu selecionar a estirpe D3.

Os resultados mostraram ainda que as estirpes que chegaram à fase final da seleção foram as obtidas a partir das amostras compostas, sugerindo que estas possuem características enológicas mais competitivas. Desta forma, quando não é relevante estudar a diversidade das estirpes de *S. cerevisiae*, é possível reduzir significativamente o trabalho e os custos dos testes de seleção de leveduras enológicas.

O programa de seleção da estirpe D3 baseou-se na avaliação de algumas características enológicas, que foram determinadas em testes à escala laboratorial. Embora estes testes em pequena escala sejam essenciais na seleção de novas estirpes vnicas, principalmente quando envolvem um grande número de estirpes, eles não reproduzem com exatidão as vinificações industriais. Por esta razão foi avaliado o comportamento fermentativo desta levedura em vinificações realizadas à escala piloto e industrial, em diferentes mostos de castas de uvas brancas (*Alvarinho*, *Loureiro*, *Batoca*, *Loureiro/Avesso*, *Chardonnay*, *Sauvignon blanc*, *Riesling* e *Gewurztraminer*) e de uvas tintas (*Touriga nacional*, *Cabernet sauvignon*, *Merlot* e *Syrah*), e nas condições tecnológicas geralmente utilizadas nos processos industriais. Em três castas de uvas brancas (*Loureiro*, *Batoca* e mistura de *Loureiro* e *Avesso*) foram realizadas fermentações em paralelo com a levedura comercial Lalvin QA23[®]. A implantação das estirpes foi efetiva em todas as fermentações, tanto as realizadas com a levedura D3 como a comercial Lalvin QA23[®]. Os tempos de fermentação com a estirpe D3 variaram entre 7 a 14 dias para as castas de uvas brancas (16, 18-20 °C) e entre 4 e 7 dias para as castas de uvas de tintas (25-28 °C). As concentrações de glicerol obtidas com a estirpe D3 foram superiores ao limiar de percepção sensorial no vinho (entre 5,8 e 13,11 g/L).

As análises aos compostos voláteis do aroma destes vinhos revelaram que os produzidos com a estirpe D3 tinham teores mais elevados de compostos em C6, de álcoois superiores, de ésteres etílicos de ácidos fixos, de acetatos, de álcoois monoterpénicos, de óxidos e dióis monoterpénicos, de C13-norisoprenóides e de fenóis voláteis, enquanto os produzidos com a estirpe Lalvin QA23® evidenciaram concentrações superiores de ésteres de ácidos gordos e ácidos gordos voláteis. Os valores da atividade de odor (OAV) revelaram que a generalidade dos compostos que tiveram um maior contributo para o aroma foram os que têm origem no metabolismo da levedura, ou seja, foram compostos que pertencem às classes químicas de álcoois superiores, ésteres de ácidos gordos, acetatos e ácidos gordos voláteis. Destes, destaca-se o éster 9-decenoato de etilo, que apenas apresentou teores superiores ao limiar de perceção nos vinhos produzidos com a estirpe D3. Este éster, que confere um aroma frutado, é produzido durante a fermentação sendo a sua formação dependente dos metabolismos do azoto e lipídico da levedura. Assim, uma vez que os valores deste composto nos três vinhos de diferentes castas são muito superiores nos produzidos com a estirpe D3, comparativamente aos obtidos com a levedura comercial, parece que esta é uma característica metabólica da estirpe selecionada.

A análise sensorial aos vinhos das castas *Loureiro* e *Avesso* revelaram que o vinho produzido com a estirpe D3 tem um aroma frutado mais intenso, tem um sabor mais persistente e que transmite uma maior sensação de calor, em comparação com o obtido com a estirpe comercial. Estas características sensoriais são fundamentadas pelos resultados das concentrações de álcoois superiores, ésteres e acetatos, que contribuem para as notas frutadas, e de etanol e de glicerol, que conferem a sensação de calor e corpo do vinho. Este trabalho demonstrou que a estirpe selecionada D3 tem um bom potencial enológico e que pode ser utilizada em vinificações à escala industrial, em castas de uvas tintas e brancas.

As estirpes de *S. cerevisiae* apresentam uma grande variedade de características fenotípicas, possuem um metabolismo fermentativo eficiente e um elevado potencial de adaptação a ambientes adversos. As 64 estirpes de *S. cerevisiae*, cujo isolamento e caracterização genética foi descrito anteriormente, são provenientes de seis regiões vitivinícolas portuguesas que apresentam diferentes características edafoclimáticas. Os diferentes *habitats* de onde estas estirpes foram isoladas podem representar um conjunto de condições e *stresses* que possivelmente contribuíram para as suas características enológicas (a emergência de fenótipos ou de características enológicas diferentes). Assim, pretendeu-se avaliar se as populações de estirpes isoladas a partir de mostos pertencentes à mesma região vitivinícola possuíam fenótipos similares e se os contextos ambientais a que estiveram sujeitas favoreceram

a ocorrência de estirpes mais adaptadas às condições vitivinícolas locais. Foram analisadas características importantes para avaliar o potencial enológico das leveduras, nomeadamente a resistência ao SO₂, a tolerância ao etanol, o fenómeno *killer*, o potencial de produção de H₂S, a actividade da β-glucosidase e da utilização da galactose como fonte de carbono. Os resultados obtidos nestes testes não apresentaram diferenças entre as populações das seis regiões vitivinícolas. Foram também realizadas microfermentações em mostos de *Loureiro* e *Avesso* e *Touriga nacional*, provenientes de duas das regiões de origem das populações em estudo (Vinhos Verdes e Douro, respetivamente). Estas fermentações permitiram comparar o desempenho fermentativo e alguns dos compostos metabolizados pelas diferentes estirpes. Relativamente a estes últimos, os resultados foram diversos, sugerindo que as estirpes utilizaram diferentes estratégias metabólicas para responder aos condicionalismos ambientais, independentemente da sua região de origem. Os resultados do desempenho fermentativo revelaram que as vinificações mais rápidas foram efetuadas pelas estirpes pertencentes à mesma região de origem do mosto, o que apoia a hipótese de que estas estão melhor adaptadas às características ecológicas e tecnológicas dos mostos da sua área de viticultura.

A indústria vitivinícola, mesmo a mais tradicional, beneficia do uso de leveduras *starter* que aumentam a eficiência de produção e/ou a qualidade do vinho produzido. Têm sido observados progressos significativos na exploração da diversidade de estirpes de leveduras presentes nos ambientes vitivinícolas, quer para utilização na produção de vinhos com leveduras autóctones (Blanco et al., 2013; Capece et al., 2010b; Lopes et al., 2007b; Rodríguez-Palero et al., 2013; Sorrentino et al., 2012; Tristezza et al., 2012) quer para a obtenção de novos *starters* para usos mais generalistas (Lallemand, 2008).

Os estudos recentes que sustentam o conceito de que existe uma componente microbiológica do *terroir* (Bokulich et al., 2014; Gayevskiy and Goddard, 2012; Knight and Goddard, 2014) são de grande importância para a indústria vitivinícola, na medida em que valorizam este recurso biológico e a sua utilização como *starter* autóctone na produção de vinhos característicos de determinadas regiões. No futuro, talvez seja possível integrar uma lista de leveduras autóctones representativas do *terroir* de cada região vitivinícola na regulamentação do setor, à semelhança do que acontece com as castas de uvas recomendadas. Na verdade, esta já é uma realidade para outros alimentos fermentados que são característicos de determinadas regiões e possuem indicação geográfica (GI) como é o caso do queijo Roquefort (Capozzi and Spano, 2011; Capozzi et al., 2012).

Para além de disponibilizar ao setor vitivinícola um serviço de isolamento, caracterização e seleção de leveduras autóctones para a produção de vinhos típicos, será também necessário encontrar uma forma simples de propagar e produzir as leveduras autóctones selecionadas. Para as empresas de produção de leveduras *starter*, a produção de pequenas quantidades de leveduras autóctones, por vezes bastante diferentes, não é lucrativa. Maqueda (2011) propôs um procedimento barato para responder rapidamente ao pedido de produção de culturas frescas de leveduras para produtores locais. No entanto, seria desejável encontrar soluções que permitam fornecer culturas de leveduras para qualquer produtor vitivinícola, independentemente da sua localização.

Outra estratégia para a obtenção de novos *starters* de leveduras para aplicação comercial é o melhoramento genético de isolados naturais, uma vez que a grande maioria não tem a potencialidade das estirpes que são melhoradas para determinadas características enológicas (e.g. determinados atributos sensoriais, floculação). Nos últimos anos, as leveduras geneticamente modificadas não têm encontrado aplicabilidade na indústria vitivinícola em virtude das regulamentações restritivas e da recusa dos consumidores. Em alternativa, está a surgir uma nova tendência: a obtenção de estirpes melhoradas por técnicas que não originam microrganismos geneticamente modificados (MGM). As estirpes melhoradas por estas técnicas podem ser aplicadas diretamente nos processos de vinificação, satisfazendo assim a procura do setor vinícola por *starters* com características enológicas particulares e/ou superiores.

Este doutoramento, que decorreu em ambiente empresarial, teve como principal propósito desenvolver novos serviços e produtos biotecnológicos para a Vinalia disponibilizar ao setor vitivinícola. O trabalho realizado possibilitou a conceção de um serviço inovador de isolamento, caracterização e seleção de leveduras enológicas autóctones, que neste estudo revelaram estar mais adaptadas às características ecológicas e tecnológicas dos mostos da sua área de viticultura, e que podem ser selecionadas “à la carte” para cada produtor e/ou região. No âmbito deste doutoramento, foi constituída uma coleção de 64 estirpes de *S. cerevisiae* provenientes das principais regiões vitivinícolas portuguesas, que é um importante recurso biológico que a empresa pode explorar para diversificar os *starters* de levedura disponíveis no mercado. No decorrer deste trabalho foi ainda selecionada uma estirpe (D3), que apresentou características enológicas diferenciadoras à escala laboratorial e que foram confirmadas à escala piloto e industrial.

CAPÍTULO VIII

BIBLIOGRAFIA

- Aksyonov, S.I., 2002. Life at extreme low humidity, in: *Astrobiology Expeditions/workshop*. St Petersburg, pp. 142–143.
- Almadanim, M.C., Baleiras Couto, M.M., Pereira, H.S., Carneiro, L.C., Fevreiro, P., Eiras-Dias, J.E., Morais-Cecilio, L., Viegas, W., Veloso, M.M., 2007. Genetic diversity of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars most utilized for wine production in Portugal. *Vitis* 46, 116–119.
- Ambroset, C., Petit, M., Brion, C., Sanchez, I., Delobel, P., Guérin, C., Chiapello, H., Nicolas, P., Bigey, F., Dequin, S., Blondin, B., 2011. Deciphering the molecular basis of wine yeast fermentation traits using a combined genetic and genomic approach. *G3 (Bethesda)*. 1, 263–81.
- Amerine, M., Cruess, W., 1960. *The Technology of Winemaking*. Technol. Winemak.
- Arthur, H., Watson, K., 1976. Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. *J. Bacteriol.* 128, 56–68.
- Attfield, P. V., Bell, P.J.L., 2003. Genetics and Classical genetic manipulations of industrial yeasts, in: J. H. de Winde (Ed.), *Functional Genetics of Industrial Yeasts*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 17–55.
- Avery, S. V., 2006. Microbial cell individuality and the underlying sources of heterogeneity. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 577–587.
- Aznar, M., López, R., Cacho, J., Ferreira, V., 2003. Prediction of aged red wine aroma properties from aroma chemical composition. Partial least squares regression models. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2700–7.
- Barnett, J., 2004. A history of research on yeasts 8: taxonomy. *Yeast* 21, 1141–1193.
- Barnett, J.A., Barnett, L., 2011. *Yeast research: a historical overview*. ASM Press.
- Barrajón, N., Arévalo-Villena, M., Rodríguez-Aragón, L.J., Briones, a., 2009. Ecological study of wine yeast in inoculated vats from La Mancha region. *Food Control* 20, 778–783.
- Barrick, J.E., Lenski, R.E., 2013. Genome dynamics during experimental evolution. *Nat. Rev. Genet.* 14, 827–39.
- Bashalkhanov, S., Rajora, O.P., 2008. Protocol : A high-throughput DNA extraction system suitable for conifers. *Plant Methods* 6, 1–6.
- Bass, D., Howe, A., Brown, N., Barton, H., Demidova, M., Michelle, H., Li, L., Sanders, H., Watkinson, S.C., Willcock, S., Richards, T. a., 2007. Yeast forms dominate fungal diversity in the deep oceans. *Proc. Biol. Sci.* 274, 3069–3077.
- Bauer, E.F., Pretorius, L.S., 2000. Yeast Stress Response and Fermentation Efficiency : How to Survive the Making of Wine - A Review. *South African J. Enol. Vitic.* 21, 27–51.

- Bellon, J.R., Eglinton, J.M., Siebert, T.E., Pollnitz, A.P., Rose, L., De Barros Lopes, M., Chambers, P.J., 2011. Newly generated interspecific wine yeast hybrids introduce flavour and aroma diversity to wines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 603–612.
- Bellon, J.R., Schmid, F., Capone, D.L., Dunn, B.L., Chambers, P.J., 2013. Introducing a New Breed of Wine Yeast: Interspecific Hybridisation between a Commercial *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast and *Saccharomyces mikatae*. *PLoS One* 8.
- Beltran, G., Torija, M.J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Rozès, N., Mas, A., 2002. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 287–93.
- Benda, I., 1982. Benda I () Wine and brandy. , 4th edn (ReedG, ed), pp. 293–402. AVI Publishing Co., Connecticut., in: ReedG (Ed.), Prescott Dunn's Industrial Microbiology. AVI Publishing Co., Connecticut, pp. 293–402.
- Bergström, A., Simpson, J.T., Salinas, F., Barré, B., Parts, L., Zia, A., Nguyen Ba, A.N., Moses, A.M., Louis, E.J., Mustonen, V., Warringer, J., Durbin, R., Liti, G., 2014. A high-definition view of functional genetic variation from natural yeast genomes. *Mol. Biol. Evol.* 31, 872–888.
- Bisson, L.F., 2012. Geographic Origin and Diversity of Wine Strains of *Saccharomyces*. *Am. J. Enol. Vitic.* 63, 165–176.
- Bisson, L.F., Karpel, J.E., 2010. Genetics of yeast impacting wine quality. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 1, 139–62.
- Bisson, L.F., Waterhouse, A.L., Ebeler, S.E., Walker, M.A., Lapsley, J.T., 2002. The present and future of the international wine industry. *Nature* 418, 697–699.
- Bizaj, E., Cordente, A.G., Bellon, J.R., Raspor, P., Curtin, C.D., Pretorius, I.S., 2012. A breeding strategy to harness flavor diversity of *Saccharomyces* interspecific hybrids and minimize hydrogen sulfide production. *FEMS Yeast Res.* 12, 456–65.
- Blanco, P., Mirás-Avalos, J.M., Orriols, I., 2012. Effect of must characteristics on the diversity of *Saccharomyces* strains and their prevalence in spontaneous fermentations. *J. Appl. Microbiol.* 112, 936–44.
- Blanco, P., Mirás-Avalos, J.M., Suárez, V., Orriols, I., 2013. Inoculation of Treixadura musts with autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains: fermentative performance and influence on the wine characteristics. *Food Sci. Technol. Int.* 19, 177–86.
- Boekhout, T., 2005. Biodiversity: gut feeling for yeasts. *Nature* 434, 449–451.
- Bokulich, N. a, Thorngate, J.H., Richardson, P.M., Mills, D. a, 2014. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E139–48.
- Bordiga, M., Piana, G., Coisson, J.D., Travaglia, F., Arlorio, M., 2014. Headspace solid-phase micro extraction coupled to comprehensive two-dimensional with time-of-flight mass

- spectrometry applied to the evaluation of Nebbiolo-based wine volatile aroma during ageing. *Int. J. Food Sci. Technol.* 49, 787–796.
- Borneman, a. R., Pretorius, I.S., 2015. Genomic Insights into the *Saccharomyces sensu stricto* Complex. *Genetics* 199, 281–291.
- Borneman, A.R., Schmidt, S. a, Pretorius, I.S., 2012. At the cutting-edge of grape and wine biotechnology. *Trends Genet.* 1–9.
- Botha, A., 2006. Yeasts in Soil. *Biodivers. Ecophysiol. Yeasts* 221–240.
- Boundy-Mills, K., 2012. Yeast culture collections of the world: meeting the needs of industrial researchers. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, 673–80.
- Brauer, M.J., 2006. Mapping Novel Traits by Array-Assisted Bulk Segregant Analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 173, 1813–1816.
- Brion, C., Ambroset, C., Sanchez, I., Legras, J.-L., Blondin, B., 2013. Differential adaptation to multi-stressed conditions of wine fermentation revealed by variations in yeast regulatory networks. *BMC Genomics* 14, 681.
- Buckling, A., Craig Maclean, R., Brockhurst, M.A., Colegrave, N., 2009. The Beagle in a bottle. *Nature* 457, 824–829.
- Cadez, N., Zupan, J., Raspor, P., 2010. The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. *FEMS Yeast Res.* 10, 619–30.
- Cadière, A., Aguera, E., Caillé, S., Ortiz-Julien, A., Dequin, S., 2012. Pilot-scale evaluation the enological traits of a novel, aromatic wine yeast strain obtained by adaptive evolution. *Food Microbiol.* 32, 332–7.
- Cadière, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., Dequin, S., 2011. Evolutionary engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with increased *in vivo* flux through the pentose phosphate pathway. *Metab. Eng.* 13, 263–271.
- Cakar, Z.P., Turanlı-Yildiz, B., Alkim, C., Yilmaz, U., 2012. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. *FEMS Yeast Res.* 12, 171–82.
- Callejon, R.M., Clavijo, A., Ortiqreira, P., Troncoso, a M., Paneque, P., Morales, M.L., 2010. Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Anal. Chim. Acta* 660, 68–75.
- Camarasa, C., Sanchez, I., Brial, P., Bigey, F., Dequin, S., 2011. Phenotypic landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: evidence for origin-dependent metabolic traits. *PLoS One* 6, e25147.

- Capece, A., Pietrafesa, R., Romano, P., 2011. Experimental approach for target selection of wild wine yeasts from spontaneous fermentation of "Inzolia" grapes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 2775–2783.
- Capece, A., Romaniello, R., Poeta, C., Siesto, G., Massari, C., Pietrafesa, R., Romano, P., 2010a. Control of inoculated fermentations in wine cellars by mitochondrial DNA analysis of starter yeast. *Ann. Microbiol.* 61, 49–56.
- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., Pietrafesa, R., Massari, C., Poeta, C., Romano, P., 2010b. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 187–92.
- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., Romano, P., 2012. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated to spontaneously fermenting grapes from an Italian "heroic vine-growing area". *Food Microbiol.* 31, 159–66.
- Capozzi, V., Russo, P., Spano, G., 2012. Microbial information regimen in EU geographical indications. *World Pat. Inf.* 34, 229–231.
- Capozzi, V., Spano, G., 2011. Food microbial biodiversity and "microbes of protected origin". *Front. Microbiol.* 2, 237.
- Cappello, M.S., Bleve, G., Grieco, F., Dellaglio, F., Zacheo, G., 2004. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *J. Appl. Microbiol.* 97, 1274–80.
- Carreto, L., Eiriz, M.F., Domingues, I., Schuller, D., Moura, G.R., Santos, M. a S., 2011. Expression variability of co-regulated genes differentiates *Saccharomyces cerevisiae* strains. *BMC Genomics* 12, 1–17.
- Carreto, L., Eiriz, M.F., Gomes, A.C., Pereira, P.M., Schuller, D., Santos, M. a S., 2008. Comparative genomics of wild type yeast strains unveils important genome diversity. *BMC Genomics* 9, 524.
- Casalta, E., Aguera, E., Picou, C., Rodriguez-Bencomo, J.-J., Salmon, J.-M., Sablayrolles, J.-M., 2010a. A comparison of laboratory and pilot-scale fermentations in winemaking conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 1665–73.
- Casalta, E., Aguera, E., Picou, C., Rodriguez-Bencomo, J.-J., Salmon, J.-M., Sablayrolles, J.-M., 2010b. A comparison of laboratory and pilot-scale fermentations in winemaking conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 1665–73.
- Cavaliere, D., McGovern, P.E., Hartl, D.L., Mortimer, R., Polsinelli, M., 2003. Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *J. Mol. Evol.* 57 Suppl 1, S226–32.
- Cavicchioli, R., Torsten, T., 2000. Extremophiles. *Encycl. Microbiol.*
- CCE, C. national des conseillers du commerce extérieur de la F., 2009. Le vin dans le monde à l'horizon 2050 – Prospectives CCEF.

- CE, 2009. DIRECTIVA 2009/41/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 6 de Maio de 2009 relativa à utilização confinada de microrganismos geneticamente modificados. J. Of. da União Eur. L 125/75, 75–97.
- Chambers, P.J., Bellon, J.R., Schmidt, S.A., Varela, C., Pretorius, I.S., 2009a. Non-Genetic Engineering Approaches for Isolating and Generating Novel Yeasts for Industrial Applications, in: Satyanarayana, T., Kunze, G. (Eds.), *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Springer Netherlands, New Delhi, India, pp. 433–454.
- Chambers, P.J., Borneman, A.R., Schmidt, S.A., Hack, J.C., Varela, C., Mercurio, M., Curtin, C.D., Cozzolino, D., Ugliano, M., Herderich, M.J., Pretorius, I., 2009b. The dawn of a new paradigm for wine yeast strain development. *Wine Ind. J.* 24, 16–18.
- Christiaens, J.F., Franco, L.M., Cools, T.L., De Meester, L., Michiels, J., Wenseleers, T., Hassan, B.A., Yaksi, E., Verstrepen, K.J., 2014. The Fungal Aroma Gene ATF1 Promotes Dispersal of Yeast Cells through Insect Vectors. *Cell Rep.* 9, 425–432.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., Domizio, P., 2010. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res.* 10, 123–33.
- Ciani, M., Rosini, G., 1993. Vinificazioni industriali in “purezza microbiologica.” *Ind. delle bevande* 22, 202–206.
- Clavijo, A., Calderón, I.L., Paneque, P., 2010. Diversity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the Serranía de Ronda (Spain) vine-growing region. *Int. J. Food Microbiol.* 143, 241–5.
- Coetzee, C., du Toit, W.J., 2012. A comprehensive review on Sauvignon blanc aroma with a focus on certain positive volatile thiols. *Food Res. Int.* 45, 287–298.
- COFALEC, n.d. No Title [WWW Document]. URL <http://www.cofalec.com/business-and-economy/> (accessed 4.29.15).
- Coloretti, F., Zambonelli, C., Tini, V., 2006. Characterization of flocculent *Saccharomyces* interspecific hybrids for the production of sparkling wines. *Food Microbiol.* 23, 672–676.
- COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS, 2009. REGULAMENTO (CE) N.º 606/2009 DA COMISSÃO. *Jornal Oficial da União Europeia*, Portugal.
- Comissão Europeia, 2015. Regulamento de execução (UE) 2015/561 da Comissão. *J. Of. da União Eur. L* 93, 12–34.
- Connell, L.B., Redman, R., Rodriguez, R., Barrett, A., Iszard, M., Fonseca, Á., 2010. *Dioszegia antarctica* sp. nov. and *Dioszegia cryoxerica* sp. nov., psychrophilic basidiomycetous yeasts from polar desert soils in Antarctica. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1466–1472.
- Cordente, A.G., Cordero-Bueso, G., Pretorius, I.S., Curtin, C.D., 2013. Novel wine yeast with mutations in YAP1 that produce less acetic acid during fermentation. *FEMS Yeast Res.* 13, 62–73.

- Cordente, A.G., Curtin, C.D., Varela, C., Pretorius, I.S., 2012. Flavour-active wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 601–18.
- Cordente, A.G., Heinrich, A., Pretorius, I.S., Swiegers, J.H., 2009. Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production. *FEMS Yeast Res.* 9, 446–459.
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Tello, J., Aporta, I., Vélez, M.D., Valero, E., 2011. Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 132–9.
- Council Regulation (EC), 2008. No. 479/2008 on the common organisation of the market in wine.
- Csoma, H., Zakany, N., Capece, A., Romano, P., Sipiczki, M., 2010. Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: comparative genotypic and phenotypic analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 140, 239–48.
- Cubillos, F. a, Billi, E., Zörgö, E., Parts, L., Fargier, P., Omholt, S., Blomberg, A., Warringer, J., Louis, E.J., Liti, G., 2011. Assessing the complex architecture of polygenic traits in diverged yeast populations. *Mol. Ecol.* 20, 1401–13.
- Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J.-N., Dubourdieu, D., 1995. Identification of a Powerful Aromatic Component of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon Wines: 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour Fragr. J.* 10, 385–392.
- Deak, T., 2009. Yeast Biotechnology: Diversity and Applications, in: Satyanarayana, T., Kunze, G. (Eds.), *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 151–168.
- Defontaine, A., Lecocq, F.M., Hallet, J.N., 1991. A rapid miniprep method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* 19, 185–185.
- Degre, R., 1993. Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria., in: GH, F. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 421–448.
- Delteil, D., 2004. Aspectos Prácticos del Levedurado en Condiciones Mediterráneas. Técnica de Inoculación y Relación entre la Población Seleccionada y la Población Indígena. *Vinidea.net, Wine Internet Tech. J.* 1–13.
- Dhar, R., Sägesser, R., Weikert, C., Yuan, J., Wagner, A., 2011. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to saline stress through laboratory evolution. *J. Evol. Biol.* 24, 1135–1153.
- Diezmann, S., Dietrich, F.S., 2009. *Saccharomyces cerevisiae*: population divergence and resistance to oxidative stress in clinical, domesticated and wild isolates. *PLoS One* 4, e5317.
- Dilworth, E., Frey, J.E., 2000. A Rapid Method for High Throughput DNA Extraction from Plant Material for PCR Amplification. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18, 61–64.

- Divol, B., du Toit, M., Duckitt, E., 2012. Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 601–13.
- Du, G., Zhan, J., Li, J., You, Y., Zhao, Y., Huang, W., 2011. Effect of Fermentation Temperature and Culture Medium on Glycerol and Ethanol during Wine Fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 63, 132–138.
- Dubourdieu, D., Tominaga, T., Masneuf, I., Peyrot, C., Murat, M.L., 2006. The Role of Yeasts in Grape Flavor Development during Fermentation : The Example of Sauvignon blanc. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 81–88.
- Duetz, W. a, 2007. Microtiter plates as mini-bioreactors: miniaturization of fermentation methods. *Trends Microbiol.* 15, 469–75.
- Dunn, B., Richter, C., Kvittek, D.J., Pugh, T., Sherlock, G., 2012. Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* pan-genome reveals a pool of copy number variants distributed in diverse yeast strains from differing industrial environments. *Genome Res.* 22, 908–24.
- Dykhuizen, D.E., Hartl, D.L., 1983. Selection in chemostats. *Microbiol. Rev.* 47, 150–168.
- Elena, S.F., Lenski, R.E., 2003. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nat Rev Genet* 4, 457–469.
- Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J., Ferreira, V., 2007. Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4501–10.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 329–337.
- Esteve-Zarzoso, B., Gostíncar, A., Bobet, R., Uruburu, F., Querol, A., 2000. Selection and molecular characterization of wine yeasts ' isolated from the "El Penedès" area (Spain). *Food Microbiol.* 17, 553–562.
- Etievant, P.X., 1991. Volatile compounds in foods and beverages. *Wine* 1.
- Fay, J.C., Benavides, J. a, 2005. Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 1, 66–71.
- Fay, J.C., Mccullough, H.L., Sniegowski, P.D., Eisen, M.B., 2004. Population genetic variation in gene expression is associated with phenotypic variation in *Saccharomyces cerevisiae* 1–14.
- Ferreira, V., Aznar, M., López, R., Cacho, J., 2001. Quantitative Gas Chromatography–Olfactometry Carried out at Different Dilutions of an Extract. Key Differences in the Odor Profiles of Four High-Quality Spanish Aged Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4818–4824.
- Ferreira, V., Cacho, J., 2009. *Wine Chemistry and Biochemistry.*

- Ferreira, V., Ortín, N., Escudero, A., López, R., Cacho, J., 2002. Chemical characterization of the aroma of Grenache rosé wines: aroma extract dilution analysis, quantitative determination, and sensory reconstitution studies. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4048–54.
- Fiore, C., Arrizon, J., Gschaedler, A., Flores, J., Romano, P., Lucano, A., 2005. Comparison between yeasts from grape and agave musts for traits of technological interest. *J. Microbiol.* 1141–1147.
- Fleet, G.H., 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* 8, 979–95.
- Francesconi, A., Kasai, M., Harrington, S.M., Beveridge, M.G., Petraitiene, R., Petraitis, V., Schaufele, R.L., Walsh, T.J., 2008. Automated and manual methods of DNA extraction for *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* analyzed by quantitative real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1978–84.
- Francis, I.L., Newton, J.L., 2005. Determining wine aroma from compositional data. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 114–126.
- Franco-Duarte, R., Mendes, I., Umek, L., Drumonde-neves, J., Zupan, B., 2014. Computational models reveal genotype – phenotype associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.*
- Fredricks, D.N., Smith, C., Meier, A., 2005. Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5122–5128.
- Gachons, C.P., Tominaga, T., Dubourdieu, D., 2002. Sulfur Aroma Precursor Present in S-glutathione Conjugate Form : Identification of S-3- (Hexan-1-ol) -glutathione in Must from *Vitis vinifera* L . cv . Sauvignon Blanc. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4076–4079.
- Gadanhó, M., Libkind, D., Sampaio, J.P., 2006. Yeast diversity in the extreme acidic environments of the Iberian pyrite belt. *Microb. Ecol.* 52, 552–563.
- Gamero, a, Manzanares, P., Querol, A., Belloch, C., 2011. Monoterpene alcohols release and bioconversion by *Saccharomyces* species and hybrids. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 92–7.
- Gawel, R., Sluyter, S.V.A.N., Waters, E.J., 2007. The effects of ethanol and glycerol on the body and other sensory characteristics of Riesling wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* 13, 38–45.
- Gayevskiy, V., Goddard, M.R., 2012. Geographic delineations of yeast communities and populations associated with vines and wines in New Zealand. *ISME J.* 6, 1281–1290.
- Genisheva, Z., 2007. Caracterização aromática varietal das castas brancas recomendadas para a produção de vinho verde. Universidade do Minho.
- Gerstein, a. C., Cleathero, L. a., Mandegar, M. a., Otto, S.P., 2011. Haploids adapt faster than diploids across a range of environments. *J. Evol. Biol.* 24, 531–540.
- Gilbert, J. a, van der Lelie, D., Zarraonaindia, I., 2014. Microbial terroir for wine grapes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 5–6.

- Giudici, P., Solieri, L., Pulvirenti, A.M., Cassanelli, S., 2005. Strategies and perspectives for genetic improvement of wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 622–628.
- Goddard, M.R., Anfang, N., Tang, R., Gardner, R.C., Jun, C., 2010. A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. *Environ. Microbiol.* 12, 63–73.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G., 1996. Life with 6000 Genes. *Science* (80-). 274, 546,563–567.
- Gómez-Míguez, M.J., Cacho, J.F., Ferreira, V., Vicario, I.M., Heredia, F.J., 2007. Volatile components of Zalema white wines. *Food Chem.* 100, 1464–1473.
- Gonzalez, R., Martinez-Rodriguez, a. J., Carrascosa, a. V., 2003. Yeast autolytic mutants potentially useful for sparkling wine production. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 21–26.
- González, R., Muñoz, R., Carrascosa, A. V, 2011. Production of Wine Starter Cultures, in: Carrascosa, A. V, Muñoz, R., González, R. (Eds.), *Molecular Wine Microbiology*. Elsevier Inc., pp. 270–298.
- González, S.S., Barrio, E., Querol, a, 2007. Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain). *J. Appl. Microbiol.* 102, 1018–25.
- González-Hernández, J.C., Cárdenas-Monroy, C. a., Peña, a., 2004. Sodium and potassium transport in the halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* 21, 403–412.
- González-Toril, E., 2003. Geomicrobiology of the Tinto River, a model of interest for biohydrometallurgy. *Hydrometallurgy* 71, 301–309.
- Grant-Preece, P.A., Pardon, K.H., Capone, D.L., Cordente, A.G., Sefton, M.A., Jeffery, D.W., Eley, G.M., 2010. Synthesis of Wine Thiol Conjugates and Labeled Analogues : Fermentation of the Glutathione Conjugate of 3-Mercaptohexan-1-ol Yields the Corresponding Cysteine Conjugate and Free Thiol. *J. Agric. Food Chem.* 58, 1383–1389.
- Gross, S., Robbins, E.I., 2000. Acidophilic and acid-tolerant fungi and yeasts. *Hydrobiologia* 433, 91–109.
- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., De Hoog, S., Plemenitaš, A., 2000. Hypersaline waters in salterns - Natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiol. Ecol.* 32, 235–240.
- Guth, H., 1997. Quantitation and Sensory Studies of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3027–3032.
- Halfmann, R., Jarosz, D.F., Jones, S.K., Chang, A., Lancaster, A.K., Lindquist, S., 2012. Prions are a common mechanism for phenotypic inheritance in wild yeasts. *Nature* 482, 363–368.
- Hammond, J., 1996. Yeast genetics, in: Priest, F., Campbell, I. (Eds.), *Brewing Microbiology*. Springer, New York, NY, pp. 43–82.

- Hara, S., Imura, Y., Oyama, H., Kozeki, T., Kitano, K., Otsuka, K., 1981. The breeding of cryophilic killer wine yeasts. *Agric. Biol. Chem.* 45, 1327–1334.
- Harju, S., Fedosyuk, H., Peterson, K.R., 2004. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnol.* 4.
- Heard, G.M., Fleet, G.H., 1987. Occurrence and Growth of Killer Yeasts during Wine Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2171–4.
- Hittinger, C.T., 2013. *Saccharomyces* diversity and evolution: a budding model genus. *Trends Genet.* 1–9.
- Hou, J., Tyo, K.E.J., Liu, Z., Petranovic, D., Nielsen, J., 2012. Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 12, 491–510.
- Hu, X.H., Wang, M.H., Tan, T., Li, J.R., Yang, H., Leach, L., Zhang, R.M., Luo, Z.W., 2006. Genetic Dissection of Ethanol Tolerance in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 175, 1479–1487.
- Hyma, K.E., Saerens, S.M., Verstrepen, K.J., Fay, J.C., 2011. Divergence in wine characteristics produced by wild and domesticated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 11, 540–551.
- Infovini, n.d. Regiões Vitivinícolas [WWW Document]. URL <http://www.infovini.com/pagina.php?codNode=18012>
- IVV, I.P., 2013. Castas portuguesas têm futuro promissor [WWW Document]. URL <http://www.ivv.min-agricultura.pt/np4/5872.html>
- IVV, I.P., n.d. A Vinha e o Vinho em Portugal [WWW Document]. URL <http://www.ivv.min-agricultura.pt/np4/91.html>
- IVV, I.P., n.d. Lista de Castas [WWW Document]. URL <http://www.ivv.min-agricultura.pt/np4/33>
- IVV, I.P., n.d. Regiões vitivinícolas de Portugal [WWW Document]. Inst. da Vinha e do Vinho. URL <http://www.ivv.min-agricultura.pt/np4/regioes>
- Jain, M.R., Zinjarde, S.S., Deobagkar, D.D., Deobagkar, D.N., 2004. 2,4,6-Trinitrotoluene transformation by a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 783–788.
- Jara, M., Cubillos, F. a, García, V., Salinas, F., Aguilera, O., Liti, G., Martínez, C., 2014. Mapping genetic variants underlying differences in the central nitrogen metabolism in fermenter yeasts. *PLoS One* 9, e86533.
- Jarosz, D.F., Brown, J.C., Walker, G. a, Datta, M.S., Ung, W.L., Lancaster, a K., Rotem, a, Chang, a, Newby, G. a, Weitz, D. a, Bisson, L.F., Lindquist, S., 2014. Cross-kingdom chemical communication drives a heritable, mutually beneficial prion-based transformation of metabolism. *Cell* 158, 1083–1093.

- Jiranek, V., Langridge, P., Henschke, P.A., 1995. Validation of Bismuth-Containing Indicator Media for Predicting H₂S-Producing Potential of *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeasts Under Enological Conditions. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 269–273.
- Johnson, E. a, 2013a. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts-the basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 7563–77.
- Johnson, E. a, 2013b. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts--the ascomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 503–17.
- Johnson, E.A., Echavarri-Erasun, C., 2011. Chapter 3 - Yeast Biotechnology, in: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts, A Taxonomic Study (Fifth Edition)*. Elsevier, London, pp. 21–44.
- Johnston, J.R., Baccari, C., Mortimer, R.K., 2000. Genotypic characterization of strains of commercial wine yeasts by tetrad analysis. *Res. Microbiol.* 151, 583–90.
- Kaern, M., Elston, T.C., Blake, W.J., Collins, J.J., 2005. Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes. *Nat. Rev. Genet.* 6, 451–464.
- Knight, S., Goddard, M.R., 2014. Quantifying separation and similarity in a *Saccharomyces cerevisiae* metapopulation. *ISME J.* 1–10.
- Kogej, T., Ramos, J., Plemenitas, A., Gunde-cimerman, N., 2005. The Halophilic Fungus *Hortaea werneckii* and the Halotolerant Fungus *Aureobasidium pullulans* Maintain Low Intracellular Cation Concentrations in Hypersaline Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6600–6605.
- Kraková, L., Chovanová, K., Ženišová, K., Turcovská, V., Brežná, B., Kuchta, T., Pangallo, D., 2012. Yeast diversity investigation of wine-related samples from two different Slovakian wine-producing areas through a multistep procedure. *LWT - Food Sci. Technol.* 46, 406–411.
- Kunicka-Styczyńska, a., Rajkowska, K., 2011. Physiological and genetic stability of hybrids of industrial wine yeasts *Saccharomyces sensu stricto* complex. *J. Appl. Microbiol.* 110, 1538–1549.
- Kurtzman, C.P., 2014. Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 325–332.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., 1998. Summary of species characteristics., in: *The Yeasts, a Taxonomic Study 2*. pp. 224–227.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., 2011. Definition , Classification and Nomenclature of the Yeasts, *The Yeasts, A Taxonomic Study*. Elsevier B.V.
- Kutyna, D.R., Varela, C., Stanley, G. a, Borneman, a R., Henschke, P. a, Chambers, P.J., 2012. Adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* to generate strains with enhanced glycerol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 1175–84.

- Kvitek, D.J., Sherlock, G., 2011. Reciprocal sign epistasis between frequently experimentally evolved adaptive mutations causes a rugged fitness landscape. *PLoS Genet.* 7.
- Kvitek, D.J., Will, J.L., Gasch, A.P., 2008. Variations in stress sensitivity and genomic expression in diverse *S. cerevisiae* isolates. *PLoS Genet.* 4, e1000223.
- Lachance, M.-A., Starmer, W., 1998. Ecology and yeasts., in: Kurtzman, C., Fell, J. (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, Amsterdam, pp. 23–30.
- Lallemant, 2008. LALVIN CLOS® : SELECTING YEAST IN A UNIQUE TERROIR 15–16.
- Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., 2000. Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 97–129.
- Le Calvez, T., Burgaud, G., Mahé, S., Barbier, G., Vandenkoornhuyse, P., 2009. Fungal diversity in deep-sea hydrothermal ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6415–6421.
- Legras, J.-L., Karst, F., 2003. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol. Lett.* 221, 249–255.
- Legras, J.-L., Merdinoglu, D., Cornuet, J.-M., Karst, F., 2007. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Mol. Ecol.* 16, 2091–102.
- Legras, J.-L., Ruh, O., Merdinoglu, D., Karst, F., 2005. Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int. J. Food. Microbiol.* 102, 73–83.
- Li, H., 2006. Wine tasting 29–106.
- Libkind, D., Hittinger, C.T., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., Gonçalves, P., Sampaio, J.P., 2011. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 14539–44.
- Liccioli, T., Tran, T.M.T., Cozzolino, D., Jiranek, V., Chambers, P.J., Schmidt, S.A., 2011. Microvinification--how small can we go? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 1621–1628.
- Liti, G., 2015. The fascinating and secret wild life of the budding yeast *S. cerevisiae*. *Elife* 4, 1–9.
- Liti, G., Carter, D.M., Moses, A.M., Warringer, J., Parts, L., James, S.A., Davey, R.P., Roberts, I.N., Burt, A., Koufopanou, V., Tsai, I.J., Bergman, C.M., Bensasson, D., Kelly, M.J.T.O., Oudenaarden, A. Van, Barton, D.B.H., Bailes, E., Ba, A.N.N., Jones, M., Quail, M.A., Goodhead, I., Sims, S., Smith, F., Blomberg, A., Durbin, R., Louis, E.J., 2009. Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature* 458, 337–341.
- Liti, G., Schacherer, J., 2011. The rise of yeast population genomics. *C. R. Biol.* 334, 612–619.
- Liu, S., Piloni, G.J., 2000. An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *Int. J. Food Sci. Technol.* 35, 49–61.

- Loeffler, J., Schmidt, K., Hebart, H., Schumacher, U., Einsele, H., 2002. Automated Extraction of Genomic DNA from Medically Important Yeast Species and Filamentous Fungi by Using the MagNA Pure LC System. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2240–2243.
- Löffler, J., Hebart, H., Schumacher, U., Reitze, H., 1997. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and Comparison of Different Methods for Extraction of DNA of Fungal Pathogens from Cultures and Blood. *J. Clin. Microbiol.* 35, 3311–3313.
- Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D., Villa, T.G., 1991. Effect of Climatic Conditions on Yeast Diversity in Grape Musts from Northwest Spain.
- Löoke, M., Kristjuhan, K., Kristjuhan, A., 2011. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques* 50, 325–328.
- Lopes, C.A., Rodríguez, M.E., Sangorrín, M., Querol, A., Caballero, A.C., 2007a. Patagonian wines: the selection of an indigenous yeast starter. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 539–46.
- Lopes, C.A., Rodríguez, M.E., Sangorrín, M., Querol, A., Caballero, A.C., 2007b. Patagonian wines: implantation of an indigenous strain of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentations conducted in traditional and modern cellars. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 139–49.
- Lopes, C.A., van Broock, M., Querol, A., Caballero, a C., 2002. *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. *J. Appl. Microbiol.* 93, 608–15.
- Lopez, V., Querol, A., Ramon, D., Fernandez-Espinar, M.T., 2001. A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 68, 75–81.
- Maksimova, I. a., Chernov, I.Y., 2004. Community structure of yeast fungi in forest biogeocenoses. *Microbiology* 73, 474–481.
- Mannazzu, I., Clementi, F. and Ciani, M., 2002. Strategies and criteria for the isolation and selection of autochthonous starters, in: Ciani, M. (Ed.), *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts*. Research Signpost.
- Maqueda, M., Zamora, E., Álvarez, M.L., Ramírez, M., 2012. Characterization, ecological distribution, and population dynamics of *Saccharomyces sensu stricto* killer yeasts in the spontaneous grape must fermentations of southwestern Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 735–743.
- Marešová, L., Sychrová, H., 2007. Applications of a microplate reader in yeast physiology research. *Biotechniques* 43, 667–672.
- MarketsandMarkets, 2014a. Starter Culture Market by Type (Yeast, Bacteria, Molds), Application [Alcoholic Beverages (Beer, Wine, Whisky), Non-Alcoholic Beverages (Dairy-based, Cereal-based, Kombucha)] & Geography - Global Trends & Forecast to 2018 [WWW Document]. URL <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/starter-culture-market-213083494.html> (accessed 4.22.15).

- MarketsandMarkets, 2014b. Yeast Market by Type [(Baker's, Brewer's, Wine, Feed, Bio-ethanol), Form (Dry, Instant, Fresh), Application (Food, Feed)] & Specialty Yeast Products Market by Type (Yeast Extract, Autolysate, β -glucan, Other Derivatives) & Geography - Global Trend & Forec [WWW Document]. URL <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/yeast-industry-268.html> (accessed 4.22.15).
- Martini, A., 1993. Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Wine Res.* 4, 165–176.
- Marullo, P., Aigle, M., Bely, M., Masneuf-Pomarède, I., Durrens, P., Dubourdieu, D., Yvert, G., 2007a. Single QTL mapping and nucleotide-level resolution of a physiologic trait in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Yeast Res.* 7, 941–52.
- Marullo, P., Yvert, G., Bely, M., Aigle, M., Dubourdieu, D., 2007b. Efficient use of DNA molecular markers to construct industrial yeast strains. *FEMS Yeast Res.* 7, 1295–1306.
- Mattick, L.R., Rice, A.C., 1970. Survey of the Glycerol Content of New York State Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 21, 213–215.
- Maxim, P., Carter, M., 2000. Cereal DNA : A Rapid High-Throughput Extraction Method for Marker Assisted Selection. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18, 357–360.
- Mcbryde, C., Gardner, J.M., Lopes, M.D.B., Jiranek, V., 2006. Generation of Novel Wine Yeast Strains by Adaptive Evolution 4, 423–430.
- McGovern, P.E., Glusker, D.L., Exner, L.J., 1996. Neolithic resinated wine. *Nature* 381, 480–481.
- McGovern, P.E., Mirzorian, A., Hall, G.R., 2009. Ancient Egyptian herbal wines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 7361–6.
- McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R. a, Nuñez, A., Butrym, E.D., Richards, M.P., Wang, C.-S., Cheng, G., Zhao, Z., Wang, C., 2004. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17593–8.
- Meilgaard, M.C., 1975. Flavor chemistry of beer. I. Flavor interaction between principal volatiles. *Tech Q Mast Brew Assoc Am* 12, 151–168.
- Mendes, I., Franco-Duarte, R., Umek, L., Fonseca, E., Drumonde-Neves, J., Dequin, S., Zupan, B., Schuller, D., 2013. Computational models for prediction of yeast strain potential for winemaking from phenotypic profiles. *PLoS One* 8, e66523.
- Metzker, M.L., 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 11, 31–46.
- Mezzetti, F., De Vero, L., Giudici, P., 2014. Evolved *Saccharomyces cerevisiae* wine strains with enhanced glutathione production obtained by an evolution-based strategy. *FEMS Yeast Res.* 1–11.
- Mortimer, R.K., Romano, P., Suzzi, G., Polsinelli, M., 1994. Genome renewal: A new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast* 10, 1543–1552.

- Mouret, J.R., Cadiere, A., Aguera, E., Rollero, S., Sablayrolles, J.M., Dequin, S., 2014. Dynamics and quantitative analysis of the synthesis of fermentative aromas by an evolved wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*.
- Murat, M.-L., Tominaga, T., Dubourdieu, D., 2001. Assessing the Aromatic Potential of Cabernet Sauvignon and Merlot Musts Used to Produce Rose Wine by Assaying the Cysteinylated Precursor of 3-Mercaptohexan-1-ol. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5412–5417.
- Nguyen, N.H., Suh, S.-O., Blackwell, M., 2007. Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from *Neuroptera* and other insects. *Mycologia* 99, 842–858.
- Nieuwoudt, H.H., Prior, B.A., Pretorius, S., Bauer, F.F., 2002. Glycerol in South African Table Wines : An Assessment of its Relationship to Wine Quality 23.
- Nikolaou, E., Soufleros, E.H., Bouloumpasi, E., Tzanetakis, N., 2006. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *Food Microbiol.* 23, 205–211.
- Noble, A.C., Bursick, G.F., 1984. The contribution of glycerol to perceived viscosity and sweetness in white wine. *Am J Enol Viticult* 35, 110–112.
- Noble, J., Sanchez, I., Blondin, B., 2015. Identification of new *Saccharomyces cerevisiae* variants of the *MET2* and *SKP2* genes controlling the sulfur assimilation pathway and the production of undesirable sulfur compounds during alcoholic fermentation. *Microb. Cell Fact.* 14, 68.
- Novo, M., Gonzalez, R., Bertran, E., Martínez, M., Yuste, M., Morales, P., 2014. Improved fermentation kinetics by wine yeast strains evolved under ethanol stress. *LWT - Food Sci. Technol.* 58, 166–172.
- OIV, 2012. Guidelines for the characterization of wine yeasts of the genus *Saccharomyces* isolated from vitivinicultural environments. Resolut. OIV-OENO 370-2012 1–30.
- OIV, 2014a. State of the Vitiviculture World Market.
- OIV, 2014b. State of the World Vitiviculture situation, in: 37th World Congress of Vine and Wine.
- OIV, 2014c. STATE OF THE VITIVINICULTURE WORLD MARKET May 2014.
- OIV, 2015. Global state of conditions report : developments and trends.
- Oliveira, J.M., 2000. Aromas varietais e de fermentação determinantes da tipicidade das castas *Loureiro* e *Alvarinho*. Universidade do Minho.
- Oliveira, J.M., Genisheva, Z., Lima, L., Vilanova, M., 2009. Easy and accurate methodology to quantify volatile compounds in fermented beverages, in: VIth Symposium in *Vino Analytica Scientia*. Angers.

- Ortiz, M.J., Barrajón, N., Baffi, M.A., Arévalo-Villena, M., Briones, A., 2013. Spontaneous must fermentation: Identification and biotechnological properties of wine yeasts. *LWT - Food Sci. Technol.* 50, 371–377.
- Pasteur, L., 1860. Mémoire sur la fermentation alcoolique. *Ann. Chim. Phys* 58, 323–426.
- Pérez, G., Fariña, L., Barquet, M., Boido, E., Gaggero, C., Dellacassa, E., Carrau, F., 2011. A quick screening method to identify β -glucosidase activity in native wine yeast strains: application of Esculin Glycerol Agar (EGA) medium. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 47–55.
- Pérez, M.A., Gallego, F.J., Martínez, I., Hidalgo, P., 2001. Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 461–466.
- Pérez-Torrado, R., Querol, A., Guillamón, J.M., 2015. Genetic improvement of non-GMO wine yeasts: Strategies, advantages and safety. *Trends Food Sci. Technol.* 45, 1–11.
- Pérez-Través, L., Lopes, C. a., Barrio, E., Querol, A., 2012. Evaluation of different genetic procedures for the generation of artificial hybrids in *Saccharomyces* genus for winemaking. *Int. J. Food Microbiol.* 156, 102–111.
- Pimenta, R.S., Alves, P.D.D., Almeida, G.M.F., Silva, J.F., Morais, P.B., Corrêa Jr., A., Rosa, C. a., 2009. Yeast communities in two Atlantic rain Forest fragments in Southeast Brazil. *Brazilian J. Microbiol.* 40, 90–95.
- Pinto, C., Pinho, D., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., Gomes, A.C., 2014. Unravelling the diversity of grapevine microbiome. *PLoS One* 9, e85622.
- Pretorius, I.S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675–729.
- Pretorius, I.S., Bauer, F.F., 2002. Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. *Trends Biotechnol.* 20, 426–32.
- Pretorius, I.S., Curtin, C.D., Chambers, P.J., 2012. The winemaker's bug: From ancient wisdom to opening new vistas with frontier yeast science. *Bioeng. Bugs* 3, 147–156.
- Pretorius, I.S., Høj, P.B., 2005. Grape and wine biotechnology: Challenges, opportunities and potential benefits. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 83–108.
- Pretorius, L.S., van der Westhuizen, T.J., 1991. The Impact of Yeast Genetics and Recombinant DNA Technology on the Wine Industry - A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic* 12, 3–31.
- Pulvirenti, A., Rainieri, S., Boveri, S., Giudici, P., 2009. Optimizing the selection process of yeast starter cultures by preselecting strains dominating spontaneous fermentations. *Can. J. Microbiol.* 55, 1–7.
- Querol, A., Barrio, E., 1990. A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* 18, 1657–1657.

- Radler, F., Schutz, H., 1982. Glycerol Production of various strains of *Saccharomyces*. Am. J. Enol. Vitic. 33, 36–40.
- Rainieri, S., Pretorius, I.S., 2000. Selection and improvement of wine yeasts 31, 15–31.
- Randez-Gil, F., Córcoles-Sáez, I., Prieto, J. a, 2013. Genetic and phenotypic characteristics of baker's yeast: relevance to baking. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 4, 191–214.
- Rankine, B.C., Bridson, D.A., 1971. Glycerol in Australian Wines and Factors Influencing Its Formation. Am. J. Enol. Vitic. 22, 6–12.
- Raspor, P., Zupan, J., 2006. Yeasts in Extreme Environments, in: Rosa, C.A., Péter, G. (Eds.), Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Springer, Berlin, pp. 371–417.
- Reed, G., Nagodawithana, T., 1988. Technology of yeast usage in wine making. Am J Enol Viticult 39, 83–90.
- Regodon, J.A., Perez, F., Valdes, M.E., De Miguel, C., Ramirez, M., 1997. A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. Food Microbiol. 14, 247–254.
- Remize, F., Sablayrolles, J.M., Dequin, S., 2000. Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol production in wine. J. Appl. Microbiol. 88, 371–8.
- Renouf, B. V, Strehaiano, P., 2006. The wine microbial consortium : A real terroir characteristic 40.
- Reportlinker, 2012. Global Yeast Market by Types, Applications, & Geography Trends & Forecasts (2011 - 2016) [WWW Document]. URL <http://www.prnewswire.com/news-releases/global-yeast-market-by-types-applications--geography-trends--forecasts-2011---2016-146240475.html> (accessed 4.30.15).
- Reportlinker, 2014. Yeast Market by Type [(Baker's, Brewer's, Wine, Feed, Bio-ethanol), Form (Dry, Instant, Fresh), Application (Food, Feed)] & Specialty Yeast Products Market by Type (Yeast Extract, Autolysate, β -glucan, Other Derivatives) & Geography - Global Trend & Forec [WWW Document]. URL <http://www.prnewswire.com/news-releases/yeast-market-by-type-bakers-brewers-wine-feed-bio-ethanol-form-dry-instant-fresh-application-food-feed--specialty-yeast-products-market-by-type-yeast-extract-autolysate-W-glucan-other-derivatives--geogra-247587301.h> (accessed 4.30.15).
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donéche, B., Lonvaud, A., 2006. Handbook of Enology - The Microbiology of Wine and Vinifications, 2nd ed, Microbiology.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 2000. The chemistry of wine and stabilisation and treatments, vol. 2.
- Robert, V., Stalpers, J., Boekhout, T., Tan, S.H., 2006. Yeast biodiversity and culture collections. Biodivers. Ecophysiol. Yeasts 31–44.

- Roberts, I.N., Oliver, S.G., 2011. The yin and yang of yeast : biodiversity research and systems biology as complementary forces driving innovation in biotechnology. *Biotechnol. Lett.* 33, 477–487.
- Rodríguez, M.E., Infante, J.J., Molina, M., Domínguez, M., Rebordinos, L., Cantoral, J.M., 2010. Genomic characterization and selection of wine yeast to conduct industrial fermentations of a white wine produced in a SW Spain winery. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1292–302.
- Rodríguez-Palero, M.J., Fierro-Risco, J., Codón, A.C., Benítez, T., Valcárcel, M.J., 2013. Selection of an autochthonous *Saccharomyces* strain starter for alcoholic fermentation of Sherry base wines. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40, 613–23.
- Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., Cavelier, F., 2011. Varietal Thiols in Wine : Discovery , Analysis and Applications. *Chem. Rev.* 111, 7355–7376.
- Roland, A., Vialaret, J., Razungles, A., Rigou, P., Schneider, R., 2010. Evolution of S-cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors during oxidation of Melon B. and Sauvignon blanc musts. *J. Agric. Food Chem.* 58, 4406–4413.
- Romano, P., Capece, A., Jespersen, L., 2006. Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts, in: Querol, A., Fleet, G. (Eds.), *Yeasts in Food and Beverages*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, pp. 13–53.
- Romano, P., Capece, A., Serafino, V., Romaniello, R., Poeta, C., 2008. Biodiversity of wild strains of *Saccharomyces cerevisiae* as tool to complement and optimize wine quality. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 1797–1802.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A., 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 169–180.
- Romano, P., Grazia Soli, M., Suzzi, G., 1983. Procedure for mutagenizing spores of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 156, 907–908.
- Roncoroni, M., 2014. Quantitative Trait Loci Mapping in Winemaking Yeast. University of Auckland.
- Roncoroni, M., Santiago, M., Hooks, D.O., Moroney, S., Harsch, M.J., Lee, S. a, Richards, K.D., Nicolau, L., Gardner, R.C., 2011. The yeast IRC7 gene encodes a β -lyase responsible for production of the varietal thiol 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wine. *Food Microbiol.* 28, 926–35.
- Rossouw, D., Jacobson, D., Bauer, F.F., 2012a. Transcriptional regulation and the diversification of metabolism in wine yeast strains. *Genetics* 190, 251–61.
- Rossouw, D., Jolly, N., Jacobson, D., Bauer, F.F., 2012b. The effect of scale on gene expression: commercial versus laboratory wine fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 1207–19.
- Rossouw, D., Naes, T., Bauer, F.F., 2008. Linking gene regulation and the exo-metabolome: a comparative transcriptomics approach to identify genes that impact on the production of volatile aroma compounds in yeast. *BMC Genomics* 9, 530.

- Rossouw, D., Olivares-Hernandes, R., Nielsen, J., Bauer, F.F., 2009. Comparative transcriptomic approach to investigate differences in wine yeast physiology and metabolism during fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6600–12.
- Rossouw, D., van den Dool, A.H., Jacobson, D., Bauer, F.F., 2010. Comparative transcriptomic and proteomic profiling of industrial wine yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3911–23.
- Rous, C.V., Snow, R., 1983. Reduction of higher alcohols by fermentation with a leucine-auxotrophic mutant of wine Yeast. *J. Inst. Brew.* 89, 274–278.
- Rupela, O.P., Tauro, P., 1984. Isolation and characterization of low hydrogen sulphide producing wine yeast. *Enzyme Microb. Technol.* 6, 419–421.
- Salinas, F., Cubillos, F.A., Soto, D., Garcia, V., Bergstrom, A., Warringer, J., Ganga, M.A., Louis, E.J., Liti, G., Martinez, C., 2012. The Genetic Basis of Natural Variation in Oenological Traits in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 7, e49640.
- Samuel, D., 1996. Investigation of ancient Egyptian baking and brewing methods by correlative microscopy. *Science* (80-). 273, 488–490.
- Santini, C., Rabino, S., 2012. Internationalisation drivers in the wine business: a RBV perspective. *Int. J. Bus. Glob.* 8, 7.
- Scanes, K.T., Hohmann, S., Prior, B.A., 1998. Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine - a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 19, 17–24.
- Schacherer, J., Shapiro, J.A., Ruderfer, D.M., Kruglyak, L., 2009. Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *S. cerevisiae*. *Nature* 458, 342–345.
- Schneider, R., Charrier, F., Razungles, A., Baumes, R., 2006. Evidence for an alternative biogenetic pathway leading to 3-mercaptohexanol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wines. *Anal. Chim. Acta* 563, 58–64.
- Schuller, D., Alves, H., Dequin, S., Casal, M., 2005. Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51, 167–77.
- Schuller, D., Cardoso, F., Sousa, S., Gomes, P., Gomes, A.C., Santos, M.A.S., Casal, M., 2012. Genetic Diversity and Population Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Different Grape Varieties and Winemaking Regions. *PLoS One* 7, e32507.
- Schuller, D., Casal, M., 2005. The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Appl. Microbiol Biotechnol* 68, 292–304.
- Schuller, D., Casal, M., 2007. The genetic structure of fermentative vineyard-associated *Saccharomyces cerevisiae* populations revealed by microsatellite analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91, 137–50.

- Schuller, D., Valero, E., Dequin, S., Casal, M., 2004. Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 231, 19–26.
- Selmecki, A.M., Maruvka, Y.E., Richmond, P. a, Guillet, M., Shores, N., Sorenson, A.L., De, S., Kishony, R., Michor, F., Dowell, R., Pellman, D., 2015. Polyploidy can drive rapid adaptation in yeast. *Nature*.
- Setati, M.E., Jacobson, D., Andong, U.-C., Bauer, F., 2012. The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map. *PLoS One* 7, e52609.
- Sicard, D., Legras, J.-L., 2011. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *C. R. Biol.* 334, 229–36.
- Simpson, R.F., 1979. Some important aroma components of white wine. *Food Technol. Aust.* 516–522.
- Sipiczki, M., 2010. Diversity, variability and fast adaptive evolution of the wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) genome—a review. *Ann. Microbiol.* 61, 85–93.
- Sláviková, E., Vadkertiová, R., 2003. The diversity of yeasts in the agricultural soil. *J. Basic Microbiol.* 43, 430–436.
- Snow, R., 1983. *Yeast Genetics*. Springer-Verlag, New York.
- Snowdon, J., Cliver, D.O., 1996. Microorganisms in honey. *Int. J. Food Microbiol.* 31, 1–26.
- Sorrentino, A., Boscaino, F., Cozzolino, R., Volpe, M.G., Ionata, E., La, F., 2012. Autochthonous Fermentation Starters for the Production of Aglianico Wines 27, 211–216.
- Soubeyrand, V., Julien, A., Sablayrolles, J.-M., 2006. Rehydration Protocols for Active Dry Wine Yeasts and the Search for Early Indicators of Yeast Activity. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 474–480.
- Souciet, J.-L., 2011. Ten years of the Génolevures Consortium: A brief history. *C. R. Biol.* 334, 580–584.
- Stanley, D., Fraser, S., Chambers, P.J., Rogers, P., Stanley, G. a., 2010. Generation and characterisation of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37, 139–149.
- Steensels, J., Snoek, T., Meersman, E., Nicolino, M.P., Voordeckers, K., Verstrepen, K.J., 2014. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 947–95.
- Steinmetz, L.M., Sinha, H., Richards, D.R., Spiegelman, J.I., Oefner, P.J., McCusker, J.H., Davis, R.W., 2002. Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast. *Nature* 416, 326–330.

- Steyer, D., Ambroset, C., Brion, C., Claudel, P., Delobel, P., Sanchez, I., Erny, C., Blondin, B., Karst, F., Legras, J.-L., 2012. QTL mapping of the production of wine aroma compounds by yeast. *BMC Genomics* 13, 573.
- Styger, G., Prior, B., Bauer, F.F., 2011. Wine flavor and aroma. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1145–59.
- Suárez-Lepe, J.A., Morata, A., 2011. New trends in yeast selection for winemaking. *Trends Food Sci. Technol.* xx, 1–12.
- Suh, S.-O., Blackwell, M., Kurtzman, C.P., Lachance, M.-A., 2006. Phylogenetics of *Saccharomycetales*, the ascomycete yeasts. *Mycologia* 98, 1006–1017.
- Suh, S.-O., McHugh, J. V., Pollock, D.D., Blackwell, M., 2005. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. *Mycol. Res.* 109, 261–5.
- Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P. a., Pretorius, I.S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 139–173.
- Swiegers, J.H., Capone, D.L., Pardon, K.H., Elsey, G.M., Sefton, M.A., Francis, I.L., Pretorius, I.S., 2007. Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma. *Yeast* 24, 561–574.
- Swiegers, J.H., Francis, I.L., Herderich, M.J., Pretorius, I.S., 2006a. Meeting consumer expectations through management in vineyard and winery the choice of yeast for fermentation offers great potential to adjust the aroma of Sauvignon Blanc wine. *Wine Ind. J.* 21, 34–42.
- Swiegers, J.H., Francis, I.L., Herderich, M.J., Pretorius, I.S., 2006b. Meeting consumer expectations through management in vineyard and winery the choice of yeast for fermentation offers great potential to adjust the aroma of Sauvignon Blanc wine 21, 34–42.
- Swiegers, J.H., Kievit, R.L., Siebert, T., Lattey, K. a, Bramley, B.R., Francis, I.L., King, E.S., Pretorius, I.S., 2009. The influence of yeast on the aroma of *Sauvignon Blanc* wine. *Food Microbiol.* 26, 204–11.
- Swiegers, J.H., Pretorius, I.S., 2007. Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 954–960.
- Thibon, C., Cluzet, S., Mérillon, J.M., Darriet, P., Dubourdieu, D., 2011. 3-Sulfanyhexanol precursor biogenesis in grapevine cells: the stimulating effect of *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Food Chem.* 59, 1344–1351.
- Tilloy, V., Ortiz-Julien, A., Dequin, S., 2014. Reduction of Ethanol Yield and Improvement of Glycerol Formation by Adaptive Evolution of the Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae* under Hyperosmotic Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 2623–32.
- Tofalo, R., Perpetuini, G., Fasoli, G., Schirone, M., Corsetti, A., Suzzi, G., 2014. Biodiversity study of wine yeasts belonging to the “terroir” of Montepulciano d’Abruzzo “Colline

- Teramane" revealed *Saccharomyces cerevisiae* strains exhibiting atypical and unique 5.8S-ITS restriction patterns. *Food Microbiol.* 39, 7–12.
- Tominaga, T., Dubourdieu, D., 2000. Identification of Cysteinylated Aroma Precursors of Certain Volatile Thiols in Passion Fruit Juice. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2874–2876.
- Tominaga, T., Gachons, C.P., Dubourdieu, D., 1998a. A New Type of Flavor Precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-Cysteine Conjugates. *J. Agric. Food Chem.* 46, 5215–5219.
- Tominaga, T., Murat, M., Dubourdieu, D., 1998b. Development of a Method for Analyzing the Volatile Thiols Involved in the Characteristic Aroma of Wines Made from *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1044–1048.
- Tran, T.M.T., Stanley, G. a., Chambers, P.J., Schmidt, S. a., 2012. A rapid, high-throughput method for quantitative determination of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. Microbiol.* 63, 677–682.
- Tristezza, M., Vetrano, C., Bleve, G., Grieco, F., Tufariello, M., Quarta, A., Mita, G., Spano, G., 2012. Autochthonous fermentation starters for the industrial production of Negroamaro wines. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, 81–92.
- Tsuji, M., Kudoh, S., Hoshino, T., 2015. Draft Genome Sequence of Cryophilic Basidiomycetous Yeast *Mrakia blollopis* SK-4, Isolated from an Algal Mat of Naga-ike Lake in the Skarvsnes Ice-Free Area, East Antarctica. *Genome Announc.* 3, 1–2.
- Turchetti, B., Hall, S.R.T., Connell, L.B., Branda, E., Buzzini, P., Theelen, B., Müller, W.H., Boekhout, T., 2011. Psychrophilic yeasts from Antarctica and European glaciers: Description of *Glaciozyma* gen. nov., *Glaciozyma martinii* sp. nov. and *Glaciozyma watsonii* sp. nov. *Extremophiles* 15, 573–586.
- Ugliano, M., Henschke, P.A., 2009. Yeasts and Wine Flavour, in: Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer New York, New York, NY, pp. 314–374.
- Urbina, H., Schuster, J., Blackwell, M., 2013. The gut of Guatemalan passalid beetles: A habitat colonized by cellobiose- and xylose-fermenting yeasts. *Fungal Ecol.* 6, 339–355.
- Uruburu, F., 2003. History and services of culture collections. *Int. Microbiol.* 6, 101–3.
- Valamoti, S.M., Mangafa, M., Koukoulis-Chrysanthaki, Ch. Malamidou, D., 2007. Grape-pressings from northern Greece: the earliest wine in the Aegean? *Free Libr.*
- Valero, E., Cambon, B., Schuller, D., Casal, M., Dequin, S., 2007. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts 7, 317–329.
- Vaughan-Martini, a, Martini, A., 1995. Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *J. Ind. Microbiol.* 14, 514–22.

- Versavaud, A., Courcoux, P., Roulland, C., Dulau, L., Hallet, J.N., 1995. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3521–3529.
- Wang, Q.-M., Liu, W.-Q., Liti, G., Wang, S.-A., Bai, F.-Y., 2012. Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity. *Mol. Ecol.* 21, 5404–17.
- Ward, A., 1992. Rapid analysis of yeast transformants using colony-PCR. *Biotechniques* 13, 350.
- Warringer, J., Zörgö, E., Cubillos, F. a, Zia, A., Gjuvsland, A., Simpson, J.T., Forsmark, A., Durbin, R., Omholt, S.W., Louis, E.J., Liti, G., Moses, A., Blomberg, A., 2011. Trait variation in yeast is defined by population history. *PLoS Genet.* 7, e1002111.
- Wines of Portugal, n.d. Regiões Vitivinícolas [WWW Document]. URL <http://www.winesofportugal.info/pagina.php?codNode=18012>
- Yalcin, S.K., Ozbas, Z.Y., 2008. Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Turkey. *Brazilian J. Microbiol.* 39, 325–332.
- Yong-Sheng Tao, Li, H., 2009. Active volatiles of cabernet sauvignon wine from Changli County. *Health (Irvine. Calif).* 01, 173–175.
- Yurkov, a. M., Kemler, M., Begerow, D., 2012. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. *Fungal Ecol.* 5, 24–35.
- Zagorc, T., Maráz, a., Cadez, N., Jemec, K.P., Péter, G., Resnik, M., Nemanič, J., Raspor, P., 2001. Indigenous wine killer yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. *Food Microbiol.* 18, 441–451.
- Zamora, F., 2009. Biochemistry of Alcoholic Fermentation, in: Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer, New York, pp. 3–22.
- Zaripov, S. a., Naumov, a. V., Abdrakhmanova, J.F., Garusov, a. V., Naumova, R.P., 2002. Models of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) initial conversion by yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 217, 213–217.
- Zarraonaindia, I., Owens, S.M., Weisenhorn, P., West, K., Hampton-marcell, J., Lax, S., Bokulich, N. a, Mills, D. a, Martin, G., Taghavi, S., Lelie, D. Van Der, Gilbert, a, 2015. The Soil Microbiome Influences Grapevine-Associated Microbiota 6, 1–10.
- Zhang, Y.-X., Perry, K., Vinci, V. a, Powell, K., Stemmer, W.P.C., del Cardayré, S.B., 2002. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature* 415, 644–646.
- Ziganshin, A.M., Gerlach, R., Borch, T., Naumov, A. V., Naumova, R.P., 2007. Production of eight different hydride complexes and nitrite release from 2,4,6-trinitrotoluene by *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7898–7905.

- Zimmer, A., Durand, C., Loira, N., Durrens, P., Sherman, D.J., Marullo, P., 2014. QTL dissection of Lag phase in wine fermentation reveals a new translocation responsible for *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to sulfite. PLoS One 9, e86298.
- Zimmermann, H.F., Anderlei, T., Büchs, J., Binder, M., 2006. Oxygen limitation is a pitfall during screening for industrial strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72, 1157–60.

ANEXO I

DINAMIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE I&D NA EMPRESA VINALIA

RESUMO

A Bolsa de Doutoramento em Empresa "Novos produtos biotecnológicos e serviços para a indústria dos vinhos", teve como finalidade proporcionar à empresa Vinalia o alargamento da gama dos seus produtos e serviços, que advêm do conhecimento científico atual. A par do trabalho de investigação desenvolvido para atingir esse objectivo, foram realizadas outras atividades para dinamizar a I&D da empresa. Os resultados positivos obtidos na seleção de leveduras motivaram a empresa a rentabilizar os trabalhos em curso tendo sido efetuada uma candidatura ao incentivo ACT[®] to Explore by Cotec e elaborado um pedido de patente. Também foram redigidos vários textos técnicos para incluir numa candidatura a um projeto QREN ID&T Empresas Individuais, que foi aprovado. Com o objetivo de alargar os contatos da Vinalia, marcou-se presença em várias feiras e eventos. Tendo em vista a certificação IDI (NP 4457: 2007), foi elaborado um de pré-diagnóstico à empresa. Foi ainda prestado apoio logístico em ações de formação.

1 DESCRIÇÃO DA EMPRESA E DOS PROJETOS DE I&D REALIZADOS/EM CURSO

A Vinalia é um *spin-off* do departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho que foi fundada em 2006 com o propósito de fornecer soluções de biotecnologia para a viticultura e enologia. A empresa assume ser um interlocutor do conhecimento de I&D entre a Universidade e o setor vitivinícola, assegurando projetos adequados às necessidades dos clientes. Neste sentido, promove o acesso dos clientes ao *know-how* científico e tecnológico assim como à tutoria por parte de investigadores experientes. As atividades de I&D da empresa estão direcionadas para os estudos da maturação da uva, assim como os seus compostos fenólicos e os compostos do aroma, para os microrganismos aplicados na produção de vinho, em particular as leveduras, e para as tecnologias da fermentação. A Vinalia presta serviços de consultoria especializada nas diferentes fases do processo de produção de vinho (qualidade das uvas, vinificação, estabilização e conservação dos vinhos) e realiza diferentes determinações analíticas (físico-químicas, microbiológicas e sensorial). A empresa organiza ainda vários programas de formação de provas organolépticas, de microbiologia enológica, de maturação da uva e de vinificação.

No âmbito das suas atividades de I&D, a Vinalia participou em diferentes projetos nacionais. O Agrocontrol, realizado em co-promoção com a Universidade do Minho, Sinergeo e Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes, permitiu desenvolver novas metodologias não-invasivas para recolha de dados contínuos do teor de humidade do solo, e assim rastrear rapidamente as áreas de vinha, usando um Radar de Penetração no Solo. Numa parceria com o departamento de Química da Universidade do Minho, a empresa realizou um estudo que visou a implementação de métodos para determinação de pesticidas em vinho, recorrendo à cromatografia de GC-MS. O trabalho reportado nesta tese – relativo ao doutoramento em empresa – em parte realizado no departamento de Biologia da Universidade do Minho, pretendeu desenvolver novos produtos biotecnológicos e serviços para a indústria dos vinhos.

2 RENTABILIZAÇÃO DOS TRABALHOS EM CURSO

No Capítulo IV deste trabalho, foi selecionada uma estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* (D3) a partir da integração dos resultados observados na fenotipagem e nas microvinificações realizadas à escala laboratorial. Os testes realizados à escala piloto e industrial, apresentados no Capítulo V, confirmaram a boa performance desta estirpe para vinificações em várias castas de uvas brancas e tintas nas condições tecnológicas geralmente utilizadas nos processos industriais, incluindo a fermentação a diferentes temperaturas. Para além do eficiente

desempenho técnico, as propriedades sensoriais observadas nos vinhos obtidos com a estirpe D3 (intenso aroma frutado, sabor persistente e sensação de calor) que foram suportadas pelos resultados das análises cromatográficas (concentrações de álcoois superiores, ésteres e acetatos, e de etanol e de glicerol), motivaram a empresa a apostar na sua comercialização. Com este propósito, a Vinalia decidiu submeter uma candidatura à iniciativa ACT[®] - Acelerador de Comercialização de Tecnologias, o ACT[®] to Explore by Cotec, tendo em vista a obtenção de apoios para o estudo da viabilidade económica e para a elaboração da proposta de negócio. Assim, em 2011, foram compiladas as informações técnicas e científicas necessárias, e elaborada a proposta para responder aos seguintes pontos:

- Ideia do Produto;
- Indústria;
- Mercado;
- *Roadmap* da prova de conceito;
- Promotores;
- Investigação & Desenvolvimento;
- Tecnologia;
- Valor da proposta.

Após a conclusão das respostas aos vários itens da candidatura, seguiu-se o agendamento de apresentações do produto a consultores da área.

No decorrer da elaboração da candidatura ao ACT[®] to Explore by Cotec, a Vinalia foi confrontada com a conveniência de proteger legalmente o produto. Assim, com o objetivo de efetuar um pré-pedido de patente, foi redigido um documento com a assessoria de uma empresa que presta serviços no registo de patentes, que foi contratada pela Vinalia. Resumidamente, nesse documento constava o âmbito, a utilidade e a aplicação da invenção, o problema técnico solucionado, as suas características principais e as vantagens, o estado da arte da técnica utilizada, a descrição detalhada da invenção, os exemplos da sua aplicação (compilação dos resultados), e as reivindicações. O pré-pedido de patente foi submetido pela empresa consultora, e após a passagem por várias fases que foram assessoradas por empresas que prestam serviços no registo de patentes, passou para a fase mundial com o número WO2013153540 e tem atualmente o número EP2837698 no registo europeu de patentes.

3 CANDIDATURA A NOVOS PROJECTOS DE I&D

A par do trabalho experimental do doutoramento, foram redigidos textos técnicos para uma candidatura a um projeto QREN ID&T Empresas Individuais para a empresa Yeast Wine. Este projeto, que foi submetido em 2012, teve como principal objetivo a caracterização genética e enológica de um grupo de isolados de leveduras, e a avaliação do seu comportamento à escala piloto, numa estação desenhada para o efeito. Sumariamente, foi dado apoio na caracterização e fundamentação técnica do projeto, na descrição e fundamentação das atividades e tarefas, e na seleção do equipamento a adquirir assim como no pedido das respetivas facturas pró-forma. Este projeto foi aprovado ainda em 2012 com a referência QREN SI I&DT – 24718 - Myeaststarter.

4 OUTROS

Durante o doutoramento foram ainda realizadas outras atividades como: a presença em feiras e eventos, com o objetivo de divulgar as actividades de I&D e alargar os contactos da empresa; a realização de um pré-diagnóstico com vista à certificação IDI (Investigação, Desenvolvimento e Inovação); e o apoio logístico nas ações de formação da empresa.

Foram estabelecidos contactos com empresas e instituições do setor vitivinícola, nacionais e internacionais, nas seguintes feiras e eventos:

- VINEXPO (2009), em Bordéus;
- Wines of Portugal Brokerage Event (2010), no Porto, organizado pela ViniPortugal e pela Adi – Agência de Inovação;
- SIAG - Salão Internacional de Agro Negócios (2012), em Santarém, *stand* conjunto das empresas promotoras do projecto QREN em co-promoção “AgroControl”;
- Salão Vinitech Sifel (2012), em Bordéus;
- VINEXPO (2013), em Bordéus.

A Vinalia participou num projeto-piloto, organizado pela TecMinho em 2011, que tinha como objetivo a elaboração de um pré-diagnóstico no âmbito de certificação em IDI (NP 4457: 2007). Essa ação envolveu a participação num *workshop* inicial, que pretendeu apresentar os objetivos e as principais características da norma, com o propósito de mobilizar e orientar as organizações a prepararem a fase do diagnóstico. Posteriormente na empresa, tendo em vista a elaboração do pré-diagnóstico, foi realizado o levantamento da informação necessária e

preparada a documentação. Concluído o pré-diagnóstico, a Vinalia decidiu ser prematuro avançar para uma certificação neste âmbito, dado o reduzido número de trabalhadores.

Ao longo do doutoramento foi sendo prestado apoio logístico às formações de prova de vinhos que foram realizadas, tais como:

- Iniciação à prova de vinhos (10 cursos), realizados no departamento de Biologia da Universidade do Minho (julho de 2009, outubro de 2009, janeiro de 2010, maio de 2010, setembro de 2010, dezembro de 2010, fevereiro de 2011, outubro de 2011, maio de 2012 e dezembro de 2012);
- Prova de vinho do Porto (dois cursos), realizados no departamento de Biologia da Universidade do Minho (setembro de 2010 e dezembro de 2011);
- Regiões vitivinícolas portuguesas (um curso), realizado no departamento de Biologia da Universidade do Minho (outubro de 2009).

ANEXO II

LISTA DAS ESTIRPES ISOLADAS

Tabela AII- 1: Códigos atribuídos às 64 estirpes de *S. cerevisiae*, isoladas e caracterizadas no âmbito deste doutoramento em empresa, castas de uvas de onde foram obtidas e regiões vitivinícolas de origem.

Código da estirpe	Casta	Região vitivinícola
AE1	<i>Aragonês</i>	Alentejo
AE2	<i>Aragonês</i>	Alentejo
AE3	<i>Aragonês</i>	Alentejo
AE4	<i>Aragonês</i>	Alentejo
AC1	<i>Aragonês</i>	Alentejo
AC2	<i>Aragonês</i>	Alentejo
AC3	<i>Aragonês</i>	Alentejo
DR1	<i>Aragonês</i>	Porto e Douro
DR2	<i>Aragonês</i>	Porto e Douro
DR3	<i>Aragonês</i>	Porto e Douro
DR4	<i>Aragonês</i>	Porto e Douro
DR5	<i>Aragonês</i>	Porto e Douro
DR6	<i>Aragonês</i>	Porto e Douro
DR7	<i>Aragonês</i>	Porto e Douro
DR8	<i>Aragonês</i>	Porto e Douro
DR9	<i>Aragonês</i>	Porto e Douro
D1	<i>Touriga Nacional</i>	Porto e Douro
D2	<i>Touriga Nacional</i>	Porto e Douro
D3	<i>Touriga Nacional</i>	Porto e Douro
D4	<i>Touriga Nacional</i>	Porto e Douro
C1	<i>Avesso</i>	Vinhos Verdes
C2	<i>Avesso</i>	Vinhos Verdes
C3	<i>Avesso</i>	Vinhos Verdes
LQ1	<i>Loureiro</i>	Vinhos Verdes
LQ2	<i>Loureiro</i>	Vinhos Verdes
LQ3	<i>Loureiro</i>	Vinhos Verdes
LQ4	<i>Loureiro</i>	Vinhos Verdes
LQ5	<i>Loureiro</i>	Vinhos Verdes
MC1	<i>Avesso</i>	Vinhos Verdes
MC2	<i>Avesso</i>	Vinhos Verdes
B1	<i>Baga</i>	Bairrada
B2	<i>Baga</i>	Bairrada
B3	<i>Baga</i>	Bairrada
B4	<i>Baga</i>	Bairrada
B5	<i>Baga</i>	Bairrada
RB1	<i>Castelão</i>	Tejo
RB3	<i>Castelão</i>	Tejo

Código da estirpe	Casta	Região vitivinícola
RB4	<i>Castelão</i>	Tejo
RB5	<i>Castelão</i>	Tejo
RB6	<i>Castelão</i>	Tejo
RM1	<i>Castelão</i>	Tejo
RM2	<i>Castelão</i>	Tejo
RM3	<i>Castelão</i>	Tejo
RM4	<i>Castelão</i>	Tejo
Da1	<i>Touriga Nacional</i>	Dão-Lafões
Da2	<i>Touriga Nacional</i>	Dão-Lafões
Da3	<i>Touriga Nacional</i>	Dão-Lafões
Da4	<i>Touriga Nacional</i>	Dão-Lafões
Da5	<i>Touriga Nacional</i>	Dão-Lafões
Da6	<i>Touriga Nacional</i>	Dão-Lafões
Da7	<i>Touriga Nacional</i>	Dão-Lafões
Da8	<i>Touriga Nacional</i>	Dão-Lafões
Da9	<i>Touriga Nacional</i>	Dão-Lafões
Da10	<i>Touriga Nacional</i>	Dão-Lafões
Da11	<i>Touriga Nacional</i>	Dão-Lafões
Da12	<i>Touriga Nacional</i>	Dão-Lafões
Da13	<i>Touriga Nacional</i>	Dão-Lafões
Da14	<i>Touriga Nacional</i>	Dão-Lafões
Da15	<i>Touriga Nacional</i>	Dão-Lafões
Da16	<i>Touriga Nacional</i>	Dão-Lafões
Da17	<i>Touriga Nacional</i>	Dão-Lafões
Da18	<i>Touriga Nacional</i>	Dão-Lafões
Da19	<i>Touriga Nacional</i>	Dão-Lafões
Da20	<i>Touriga Nacional</i>	Dão-Lafões

ANEXO III

DADOS COMPLEMENTARES

Figura AIII-1: Valores do rácio A_{260}/A_{280} do DNA obtido de 12 estirpes de *S.cerevisiae* e de outras 12 espécies de levedura, recorrendo aos métodos de extração com microtubos e com microplacas.

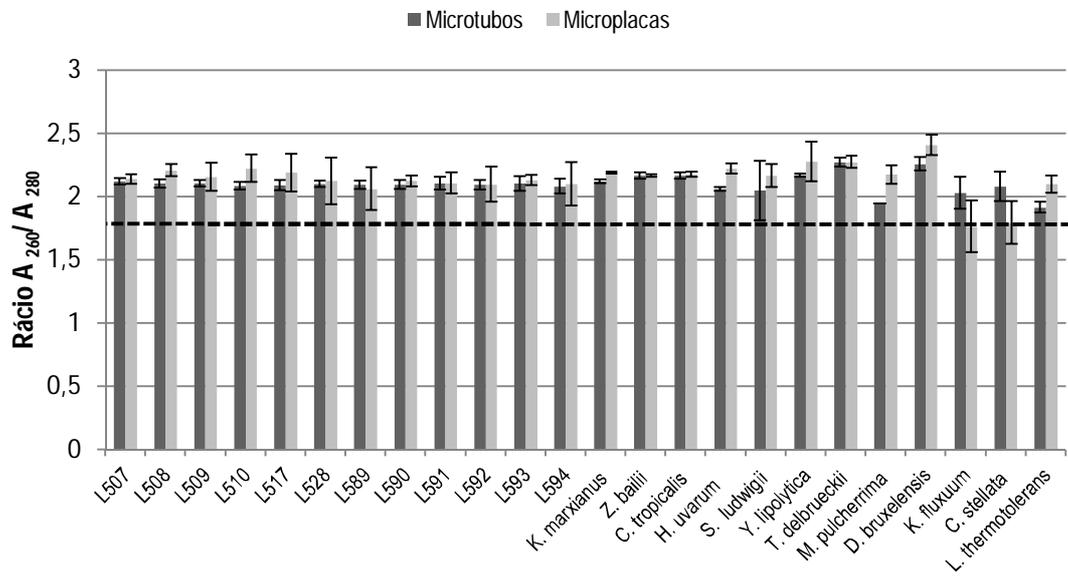


Figura AIII-2: Resumo das fermentações realizadas pelas 64 estirpes de *S.cerevisiae* provenientes de seis regiões vitivinícolas, realizadas em mosto de Loureiro e Aveso e de Touriga Nacional. A parte mais clara das barras corresponde à fase de latência até ao começo da fermentação (número de dias até perda de massa de 2 g/L), e a parte mais escura corresponde à duração da fermentação (número de dias desde a perda de massa de 2 g/L até peso constante). A percentagem de estirpes de cada região que terminaram a fermentação está indicada no eixo horizontal de cada um dos gráficos.

