

THAIS MARTINS GUIMARÃES

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE CEPAS DE
LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* PARA ELABORAÇÃO DE
VINHO**

CURITIBA
2005

THAIS MARTINS GUIMARÃES

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE CEPAS DE
LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* PARA ELABORAÇÃO DE
VINHO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, como pré-requisito à obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dra. Tania Maria Bordin Bonfim

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Cyntia Maria Telles F. Pichet

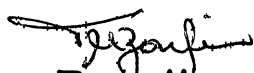
CURITIBA
2005

TERMO DE APROVAÇÃO

THAIS MARTINS GUIMARÃES

Título: **"Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho"**

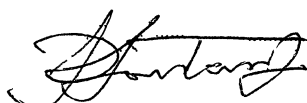
Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná.



Prof^ª. Dra Tania Maria Bordin Bonfim
Orientadora



Prof. Tit Michele Vitolo
Universidade de São Paulo



Prof Tit José Domingos Fontana
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 21 de fevereiro de 2005

Ao meu pai Luiz Alberto, a quem tanto admiro, exemplo de vida e de luta a ser sempre seguido;

À minha mãe Meire, que com sua extrema força e garra me motiva e inspira a continuar a trilhar o meu caminho;

À Coordenação do Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas e aos seus professores pelos ensinamentos ministrados, em especial ao Prof. Dr. Cid Aimbiré Santos de Moraes, pelo apoio;

À Profa. Dra. Tania Maria Bordin Bonfim, que desde o final de minha graduação acadêmica vem sabiamente guiando meus trabalhos de pesquisa, tendo seus ensinamentos e encorajamento constantes sido fundamentais para minha formação acadêmica e científica. É na qualidade de sua orientada que quero expressar o meu mais sincero agradecimento a ela que, aceitou ser minha orientadora, mostrando-me, sempre com toda a delicadeza que lhe é peculiar, minhas fraquezas e como superá-las, respeitando o meu estilo de pesquisa e autoria e destacando os meus saberes e competências. Agradeço ainda pelas condições de trabalho que me proporcionou, pela disponibilidade demonstrada, pela paciência com que combateu meu pessimismo em algumas etapas do trabalho e, sobretudo, pela amizade em todos os momentos;

A Profa. Dra. Cyntia Maria Telles Fadel Pichet por ter me recebido, pela co-orientação do estudo e pelas contribuições na discussão dos resultados;

A Profa. Dra. Iara Pereira Machado, que mesmo estando distante mostrou-se sempre atenciosa e pronta a ajudar;

À Profa. Dra. Miriam Blumel Chociai, que nos permitiu espaços para discussão de algumas questões aqui desenvolvidas;

À Profa. Dra. Sandra Barreira o meu agradecimento pela atenção dedicada na leitura de partes do texto e ao Prof. Geraldo Pichet, pela colaboração prestada;

Ao Prof. Dr. Maurício Passos pela ajuda com as análises de cromatografia líquida de alta eficiência;

À Cassyano J. Correr pela ajuda prestada no tratamento estatístico dos resultados.

À Valdina Celestino Rocha pela ajuda, companheirismo e amizade desfrutados no dia a dia do laboratório;

Aos meus colegas, Juliana Negrão Borges, Juliana Adelman, Daniela Dorneles, companheiros de laboratório e de pesquisa, pela ajuda, companheirismo e amizade desfrutados no dia a dia do laboratório;

À Danilo Gomes Moriel pelo apoio sempre constante, harmoniosa convivência e mesmo estando longe contribuiu para a realização deste trabalho;

Aos vinicultores do município de Colombo por toda a colaboração na cedência das uvas e amostras para o estudo;

Às minhas irmãs Daniele e Ivy, que sempre acreditaram na conclusão deste trabalho, companheiras de todas as horas, agradeço pelo carinho e amizade;

Especialmente ao meu namorado Rafael Fajardo de Francisco, pelas horas que a realização deste trabalho nos privou do convívio comum; obrigada pelo amor, paciência e compreensão;

À Luiz Carlos Bordin, um especial agradecimento pela sua preciosa colaboração, sempre disposto a ajudar na realização do trabalho laboratorial;

À Carlos Bonfim, pela paciência e apoio;

Aos amigos e amigas que incentivaram o trabalho e me apoiaram em momentos difíceis. Não vou tentar citar todos para não cometer nenhum esquecimento. No entanto quero agradecer, em especial, a Carina Rau La Rosa e Camila Guimarães Moreira, que souberam ser pacientes, consoladoras e incentivadoras nos momentos certos;

Agradeço a todos que estiveram ao meu lado e me ajudaram de alguma forma;

E... sobretudo a Deus.

"Pensar não se reduz, acredito eu, em falar, classificar em categorias, nem mesmo abstrair. Pensar é agir sobre o objeto e transformá-lo" (Jean Piaget)

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	05
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	07
3.1 UVAS DESTINADAS À ELABORAÇÃO DE VINHOS.....	08
3.2 PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE UVAS E VINHOS NO BRASIL.....	09
3.3 LEVEDURAS.....	13
3.3.1 Características gerais.....	13
3.3.2 Importância econômica das leveduras.....	14
3.3.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
3.4 PROCESSO FERMENTATIVO.....	17
3.4.1 Sistema clássico de vinificação.....	17
3.4.2 Fermentação espontânea.....	18
3.4.3 Bioquímica da fermentação.....	19
3.4.4 Fatores que afetam o desempenho fermentativo.....	21
3.5 USO DE LEVEDURAS SELECIONADAS.....	22
3.6 IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DE INTERESSE ENOLÓGICO.....	25
3.7 SELEÇÃO DE LEVEDURAS.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 MATERIAIS.....	34
4.2 MÉTODOS GERAIS.....	34
4.3 METODOS ANALÍTICOS.....	36
4.3.1 Carboidratos totais.....	36
4.3.2 Método turbidimétrico	36
4.4 COLETA DAS AMOSTRAS PARA ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS.....	36
4.5 MEIOS DE CULTURA.....	37

4.5.1 Meio YP.....	37
4.5.3 Meio YCB.....	38
4.5.4 Meio Agar LA.....	38
4.6 ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS.....	39
4.7 CONSERVAÇÃO DAS LEVEDURAS.....	40
4.8 PREPARO DO INÓCULO.....	40
4.9 TESTE DE EXCLUSÃO POR ESTRESSE.....	41
4.10 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LEVEDURAS.....	42
4.10.1 Testes de assimilação de fontes de carbono.....	42
4.10.2 Testes de assimilação de fontes de nitrogênio.....	42
4.10.3 Testes de capacidade fermentativa.....	43
4.11 OUTROS CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DE LEVEDURAS.....	43
4.11.1 Teste de tolerância ao etanol.....	43
4.11.2 Teste de tolerância à temperatura.....	44
4.11.3 Teste de floculação.....	44
4.11.4 Teste de produção de sulfeto de hidrogênio.....	44
4.12 CARACTERIZAÇÃO DAS LEVEDURAS SELECIONADAS POR ENSAIOS MOLECULARES.....	45
4.12.1 Cultivo das leveduras selecionadas.....	45
4.12.2 Extração do DNA genômico das leveduras.....	45
4.12.3 Quantificação do DNA genômico.....	46
4.12.4 Amplificação do DNA genômico pela Reação em Cadeia da Polimerase.....	46
4.12.5 Reação em cadeia da polimerase – polimorfismo de DNA amplificado ao acaso.....	47
4.13 EXPERIMENTOS DE MICROVINIFICAÇÕES.....	49
4.13.1 Preparo do mosto do suco de uva.....	49
4.13.2 Microvinificação.....	49
4.14 REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS.....	51

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 ISOLAMENTO DAS EVEDURAS.....	53
5.2 EXCLUSÃO POR ESTRESSE.....	55
5.3 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS EVEDURAS.....	57
5.4 OUTROS CRITÉRIOS D SELEÇÃO DAS LEVEDURAS.....	61
5.5 CARACTERIZAÇÃO DAS LEVEDURAS SELECIONADAS POR ENSAIOS MOLECULARES.....	67
5.6 EXPERIMENTOS DE MICROVINIFICAÇÕES.....	78
6. CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	90

FIGURA 1 -	PORCENTAGEM DE LEVEDURAS ISOLADAS CRESCIDAS EM CONDIÇÃO DE ESTRESSE TÉRMICO, ETANÓLICO, OSMÓTICO E NA PRESENÇA DE SACAROSE	56
FIGURA 2 -	VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO APÓS CRESCIMENTO EM MEIO ÁGAR LA DAS LEVEDURAS SELECIONADAS 24, 33, 52 E LEVEDURA CK	66
FIGURA 3 -	AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS INICIADORES SC1 E SC2.....	69
FIGURA 4 -	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE REALIZADA COM INICIADORES SC1 E SC2.....	69
FIGURA 5 -	PERFIL DE RAPD-PCR UTILIZANDO INICIADOR OPB-12.....	71
FIGURA 6 -	PERFIL DE RAPD-PCR UTILIZANDO INICIADOR OPB-01.....	71
FIGURA 7 -	PERFIL DE RAPD-PCR UTILIZANDO INICIADOR OPB-10.....	72
FIGURA 8 -	PERFIL DE RAPD-PCR UTILIZANDO INICIADOR OPX-01.....	73
FIGURA 9 -	PERFIL DE RAPD-PCR UTILIZANDO INICIADOR OPX-03.....	74
FIGURA 10 -	PERFIL DE RAPD-PCR UTILIZANDO INICIADOR OPX-06.....	74
FIGURA 11 -	PERFIL DE RAPD-PCR UTILIZANDO INICIADOR OPX-07.....	75
FIGURA 12 -	PERFIL DE RAPD-PCR UTILIZANDO INICIADOR P-20.....	76
FIGURA 13 -	PERFIL DE RAPD-PCR UTILIZANDO INICIADOR AB1-15.....	76
FIGURA 14 -	DENDOGRAMA CONSTRUÍDO A PARTIR DO PERFIL OBTIDO POR RAPD - PCR.....	78
FIGURA 15 -	CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS, ETANOL E GLICEROL NO PROCESSO FERMENTATIVO, UTILIZANDO LEVEDURAS SELECIONADAS 33, 37, 49, 50, 51, CK E NA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA APÓS SETE DIAS.....	81
FIGURA 16 -	CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS, ETANOL, GLICEROL, ÁCIDO ACÉTICO E ÁCIDO SUCCÍNICO NO PROCESSO FERMENTATIVO UTILIZANDO A LEVEDURA SELECIONADA 49 EM FUNÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO (DIAS).....	82

- FIGURA 17 - CONCENTRAÇÃO DE ETANOL NOS PROCESSOS FERMENTATIVOS UTILIZANDO LEVEDURAS SELECIONADAS, LEVEDURA COMERCIAL E NA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA, APÓS 20 DIAS.....83
- FIGURA 18 - CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO, ÁCIDO SUCCÍNICO E GLICEROL NOS PROCESSOS FERMENTATIVOS UTILIZANDO LEVEDURAS SELECIONADAS, LEVEDURA COMERCIAL E NA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA, APÓS 20 DIAS.....84
- FIGURA 19 - CONTROLES DA MICROVINIFICAÇÃO: MOSTO DE UVA ESTÉRIL SEM INOCULAÇÃO, MOSTO DE UVA INOCULADO COM A LEVEDURA SECA ATIVA (*Saccharomyces cerevisiae* variedade *cerevisiae* - CK), MOSTO DE UVA SEM INOCULAÇÃO (FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA).....87

TABELA 1	PRODUÇÃO DE UVAS NO BRASIL, EM TONELADAS.....	11
TABELA 2	ÁREA DE VIDEIRAS PLANTADAS NO BRASIL, EM ECTARES...	12
TABELA 3	SEQUÊNCIA DOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR	47
TABELA 4	SEQUÊNCIA DOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE RAPD-PCR	48
TABELA 5	GRUPOS DE LEVEDURAS ISOLADAS A PARTIR DE UVAS VARIEDADE TERCÍ, SUCOS DAS UVAS, AMOSTRAS DA FASE TUMULTUOSA DA FERMENTAÇÃO VÍNICA E VINHOS SAFRA 2003, EMPREGANDO DIFERENTES MEIOS DE CULTURA	54
TABELA 6	CRESCIMENTO DAS LEVEDURAS ISOLADAS E LEVEDURA CK EM MEIO DE CULTURA CONTENDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO NA CONCENTRAÇÃO DE 2 g%	59
TABELA 7	ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE NITROGÊNIO PELAS LEVEDURAS ISOLADAS E LEVEDURA CK	60
TABELA 8	CAPACIDADE FERMENTATIVA DAS LEVEDURAS ISOLADAS E DA LEVEDURA CK, UTILIZANDO MEIO YP ADICIONADO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO	61
TABELA 9	VARIAÇÃO NO CRESCIMENTO DAS LEVEDURAS SELECIONADAS E DA LEVEDURA CK EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ETANOL E DA TEMPERATURA UTILIZANDO MEIO YPG 2%	64
TABELA 10	CAPACIDADE DE FLOCULAÇÃO E PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO DAS LEVEDURAS SELECIONADAS E DA LEVEDURA CK	67

%	- por cento
±	- mais ou menos
μl	- microlitro
AB1	- Advanced Biotechnologies
atm	- atmosfera
ATP	- adenosina tri fosfato
BC	- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> variedade <i>bayanus</i>
CK	- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> variedade <i>cerevisiae</i>
C ₆ H ₁₂ O ₆	- glicose
C ₂ H ₅ OH	- etanol
CO ₂	- gás carbônico
DNA	- ácido desoxiribonucleico
DO	- densidade ótica
et. al.	- e colaboradores
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
f.	- número de folhas
g	- gramas
g%	- gramas por cento
g/l	- gramas por litro
HCl	- ácido acético
kg	- quilograma
l	- litro
M	- molar
mg/l	- miligramas por litro
ml	- mililitro
mM	- milimolar
n.	- número
NADH	- nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

ng	- nanograma
nm	- nanômetro
OPB	- Operon Technologies kit B
OPX	- Operon Technologies kit X
°Brix	- gramas por cento de sólidos totais
°C	- grau Celsius
°GL	- grau Gay-Lussac
p.	- página
P - 20	- primer 20
p/v	- peso por volume
p/p	- peso por peso
pb	- pares de base
PCR	- reação em cadeia da polimerase
pH	- potencial hidrogeniônico
pmol	- picomol
qsp	- quantidade suficiente para
RAPD	- análise de polimorfismo ao acaso de DNA genômico
RNA	- ácido ribonucléico
SC	- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
v.	- volume
v/v	- volume por volume

Entre as diferentes castas de uvas cultivadas no Paraná, a variedade Terci é a mais utilizada para o preparo de vinho tinto na região de Colombo, levando a uma produção anual de 800.000 l de vinho artesanal. Desde 1999, a Universidade Federal do Paraná e a comunidade de Colombo têm trabalhado juntas para melhoramento da tecnologia de produção do vinho. Dessa forma, foi realizada uma avaliação da microbiota natural de Colombo com objetivo de selecionar leveduras apropriadas para a produção de vinho. A partir de 61 leveduras isoladas, 14 foram identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* e submetidas a caracterização molecular e ensaios de microvinificação. Os ensaios de microvinificação foram realizados para avaliar a produção de etanol, glicerol, ácido acético, ácido succínico e assimilação de açúcares. Todas as leveduras foram capazes de realizar uma fermentação completa, com etanol variando entre 113 a 135 g/l, produção de glicerol em torno de 1 g/l e pouca quantidade de ácido acético e ácido succínico. A caracterização molecular permitiu a classificação das leveduras em três grupos diferentes, mas nenhuma relação entre a classificação genética e as características fenotípicas avaliadas foram verificadas.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, microvinificação, vinho, RAPD-PCR

Amongst the different lineages of grapes cultivated in Paraná, Terci variety is the most used for red wine production in Colombo, leading to an annual production of 800,000 l of artisan wine. Since 1999, the Universidade Federal do Paraná and Colombo community have been working together for the improvement of its wine production technology. In this way, an evaluation of Colombo natural microbiota was performed in order to select yeasts most appropriate for wine production. Among the 61 yeasts isolated, 14 were identified as *Saccharomyces cerevisiae* and submitted to molecular characterization and microvinification assays. The microvinification assays were done in order to evaluate the production of ethanol, glycerol, acetic acid, succinic acid and sugar assimilation. All the yeasts were able to perform a complete fermentation, with ethanol variation between 113 and 135 g/l, glycerol production around 1 g/L and low amounts of acetic and succinic acid. The molecular characterization allowed the classification of the yeasts in three different groups, but no relationship between the genetic classification and the phenotypic characteristics evaluated were verified.

Key-words: *Saccharomyces cerevisiae*, microvinification, wine, RAPD-PCR

O vinho é definido como a bebida proveniente da fermentação alcoólica do mosto de uva sadia, fresca e madura por leveduras vínicas naturalmente presentes neste meio de fermentação (BENASSI, 1997).

Muitos estudos foram realizados sobre as leveduras vínicas desde que Pasteur, em 1866, demonstrou que elas eram responsáveis pela transformação dos açúcares do mosto em etanol. A partir de então, ficou claro que as fermentações alcoólicas realizadas espontaneamente não são devidas à ação de uma única levedura e sim que se trata do resultado da ação combinada de diversas espécies de leveduras que crescem em diferentes proporções ao longo de uma fermentação. De qualquer maneira, dentro das espécies de leveduras que podem ser encontradas em uma fermentação alcoólica, percebeu-se que a espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a mais apta a consumir todos os açúcares fermentáveis e, portanto, assegurar o processo (CATALUÑA, 1984; JOSHI e PANDEY, 1999).

Os estudos sobre a dinâmica, quantificação e composição da microbiota responsável pelas fermentações espontâneas mostram diferenças tanto qualitativas quanto quantitativas das leveduras isoladas de uma mesma área vitivinícola. As causas desta variabilidade podem estar associadas às diferenças do ecossistema como composição do solo, condições climáticas e variedade das uvas, entre outros. Estas assimilaridades ocorrem não somente entre diferentes regiões, mas também dentro da mesma região em diferentes vindimas, prejudicando a qualidade e reprodutibilidade na obtenção do vinho (LOPES et. al., 2002).

Pela necessidade de assegurar a fermentação alcoólica, assim como a qualidade e reprodutibilidade das características dos vinhos, muitos produtores têm utilizado culturas puras de leveduras isoladas de seu próprio vinho como cultivos iniciadores. Estas culturas, na forma de leveduras secas ativas, são fornecidas aos produtores e inoculadas no mosto a fim de conduzir a fermentação e o vinho produzido terá, em sucessivas vindimas, as propriedades sensoriais típicas daquela região (GONZÁLEZ-PEREZ, et al., 1993).

Apesar da existência de leveduras comerciais para a realização de fermentações, é mais efetiva a utilização de cultivos puros de leveduras que

procedam da região vitivinícola, o que se conhece como *leveduras locais selecionadas*. Estas leveduras são específicas de uma área, totalmente adaptadas às condições climáticas da região e à matéria-prima e parcialmente responsáveis, pelas características únicas do vinho a ser obtido (MARTINI e MARTINI, 1990).

As leveduras selecionadas têm sido utilizadas com excelentes resultados em muitos países, onde os produtos finais obtidos são de qualidade mais uniforme que os produzidos por fermentações espontâneas. Portanto, a seleção da levedura adequada para cada tipo de fermentação é uma estratégia importante para garantir uma fermentação completa, assim como para melhorar as características finais do vinho. Ainda que seja evidente que a qualidade do vinho esteja associada à variedade e qualidade da uva, as leveduras podem produzir compostos que proporcionem um toque de distinção ao produto final obtido (DEQUIN, 2001).

Assim, com a finalidade de melhorar os parâmetros de qualidade e garantir uma melhor padronização de suas características, sugere-se utilizar leveduras selecionadas que otimizarão o processo fermentativo e tornará o vinho obtido mais competitivo no mercado. À medida que esses procedimentos são aplicados, deixa-se de lado o empirismo e permite-se obter um vinho de melhor qualidade a cada safra (Embrapa Uva e Vinho, 1987; COMI e CROATTINI, 1997; PRETORIUS; VAN DER WESTHUIZEN; AUGUSTYN, 1999; CHOCIAI et. al., 2000; LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000; PRETORIUS, 2000; LOPES et. al., 2002).

Nos processos de seleção de leveduras, várias metodologias de classificação taxonômica são utilizadas para a identificação, baseadas na descrição morfológica e fisiológica de espécies e gêneros. Embora estas metodologias forneçam valiosas informações na identificação das leveduras, apresentam a desvantagem de serem demoradas e nem sempre determinantes ou concludentes, em razão de que as características morfológicas e fisiológicas estão fortemente influenciadas pelas condições de cultivo. Este é um dos motivos que vem introduzindo erros na classificação taxonômica e originando o fenômeno de dualidade na nomenclatura (RATÓN, 2004).

Estas dificuldades vêm sendo solucionadas com a aplicação de técnicas moleculares baseadas nas análises de fragmentos de ácidos nucléicos, sendo as mais utilizadas a eletroforese de cariotipagem, as análises de microsátélites, o polimorfismo do DNA mitocondrial (mtDNA), o polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição do rDNA (RFLP), o polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente (RAPD) e as análises de RNA de baixo peso molecular (LMW-RNA). Estas técnicas envolvem procedimentos simples e rápidos e têm sido bastante utilizadas para identificar e diferenciar leveduras de uma mesma espécie, contribuindo com mais um parâmetro no controle de qualidade e na taxonomia de leveduras (RATÓN, 2004).

Desde 1999, um projeto de extensão firmado entre a Universidade Federal do Paraná e a comunidade de Colombo visa a observação criteriosa do processo artesanal utilizado pelos produtores da região para caracterizar as principais dificuldades técnicas e apresentar propostas alternativas de melhoramento da tecnologia de produção do vinho (BONFIM et. al., 2002).

O fato de que safras distintas produzem vinhos com composição e características diferentes associado à busca por espaço no mercado nacional são fatores que reforçam a necessidade de se garantir a qualidade do vinho. Entretanto, para que um tecnólogo de bebidas possa modificar estas características e/ou controlar a qualidade de um produto, é necessária a incorporação de leveduras selecionadas que contribuam para a manutenção da identidade e da qualidade do vinho produzido.

Assim sendo, o presente trabalho visa o isolamento de leveduras nativas do município de Colombo localizado à nordeste da região metropolitana de Curitiba, no Estado do Paraná, adaptadas às condições de clima e solo, e possuidoras de características desejáveis para obtenção de um bom vinho, com a finalidade de melhorar os parâmetros de qualidade e garantir melhor padronização das características do vinho da região.

2.1. OBJETIVO GERAL

Isolar, identificar e selecionar leveduras vínicas do gênero *Saccharomyces*, a partir da microflora presente nas uvas Terci cultivadas e de etapas do processo fermentativo, com características apropriadas para atender às condições empregadas no processo artesanal de produção de vinho.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- isolamento e seleção de leveduras *Saccharomyces*;
- caracterizar as leveduras selecionadas utilizando RAPD-PCR (Reação em cadeia da polimerase - análises de Polimorfismo de DNA amplificado ao Acaso);
- avaliar as leveduras selecionadas em um processo de microvinificação onde o produto será submetido a análises de concentração de açúcares (glicose, sacarose e frutose), etanol, glicerol, ácidos acético e succínico.

3.1 UVAS DESTINADAS À ELABORAÇÃO DE VINHOS

A matéria-prima da indústria vinícola é a uva, a partir da qual se elabora o mosto para a produção de vinho. A composição das uvas influencia a estrutura do vinho não simplesmente pelo teor de açúcar fornecido para a fermentação, como também pelo seu teor de nitrogênio, potássio, acidez, seus aromas vegetativos e seu estado sanitário (ZOECKLEIN et. al., 2001).

As uvas destinadas ao processo de elaboração de vinhos podem ser divididas em duas categorias: *Vitis vinifera*, utilizada para a fabricação de vinhos finos e *Vitis labrusca*, empregada na obtenção de vinhos comuns. No Brasil, as variedades de uvas da espécie *Vitis vinifera* têm seu cultivo praticamente limitado aos Estados mais frios do país, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, e sua produção tem sido experimentada também em Pernambuco, ao longo do rio São Francisco. As uvas da espécie *Vitis labrusca* devido a sua rusticidade e resistência, são cultivadas nos demais Estados onde a indústria vinícola se instalou, como Minas Gerais, São Paulo e Paraná (COBRA, 2003).

Os principais açúcares presentes nas uvas dos cultivares de *Vitis vinifera* são glicose e frutose que, geralmente são responsáveis por 99% dos carboidratos no mosto e por 12 a 27% ou mais do peso das uvas maduras. A sacarose é o principal açúcar translocado das folhas para os frutos em videiras, mas glicose e frutose predominam nos grãos de uvas em todos os estágios do desenvolvimento. A relação glicose/frutose nos grãos de uva muda consideravelmente desde a frutificação até a maturação. Geralmente, na fase de crescimento do grão predomina a glicose. Na maturação, glicose e frutose estão presentes em quantidades semelhantes. Na fase de sobrematuração geralmente a frutose excede a glicose. Em climas frios, nos quais o teor de açúcares totais é mais baixo, há uma tendência de se desenvolverem cultivares com maior teor de frutose; o contrário ocorre em climas quentes (DAUDT; SIMON, 2001).

Para elaboração de vinhos de qualidade, todo álcool deve ser formado via fermentativa, pelas leveduras, sem adição exógena. A legislação brasileira determina que os vinhos de mesa devem ter entre 10 e 13 °GL de álcool

(PORTARIA n. 229 do Ministério da Agricultura, 1988). Para a obtenção de 1 °GL de álcool na fermentação, são necessários cerca de 18 g/l de açúcar na uva. Assim, se a uva não contiver o teor necessário de açúcar, deve se adicionar açúcar de cana, no início da fermentação. Essa prática, denominada chaptalização, é legalmente autorizada e empregada quando as condições climáticas da safra não permitem o acúmulo de quantidade adequada de açúcar na uva. Além da concentração de açúcares, outro critério de medida da maturação da uva e, portanto, do seu potencial em produzir vinhos de qualidade, é o teor em ácidos. Este critério normalmente é empregado juntamente com a medida do teor de açúcar, pois o balanço entre açúcar e acidez confere ao vinho um equilíbrio gustativo determinante para sua qualidade geral. A uva convenientemente avaliada ao longo da maturação será colhida no momento mais adequado à máxima expressão do seu potencial de qualidade em determinada safra ou região. Desse modo, os procedimentos a serem adotados na colheita devem levar em consideração a preservação desse potencial (GUERRA, 2003). Por exemplo, no sul do Brasil, e particularmente na região metropolitana de Curitiba, a colheita da uva é determinada pelo vinicultor o qual geralmente utiliza como critério o teor de açúcar (BONFIM et. al., 2002) o mesmo adotado pelos produtores de vinho na serra gaúcha (RIZZON et. al., 1992).

3.2 PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE UVAS E VINHOS NO BRASIL

No Rio Grande do Sul concentra-se mais de 90% da produção de vinho do país e lá estão as melhores vinícolas brasileiras. A maior parte destas vinícolas está localizada na Serra Gaúcha, região de montanha a nordeste no estado, destacando-se as cidades de Bento Gonçalves, Garibaldi e Caxias do Sul, e vários outros municípios menores; em Erechim, no noroeste do estado; Jaguari, no sudoeste; Viamão e São Jerônimo, no centro-leste; Bagé, Don Pedrito, Pinheiro Machado e Santana do Livramento, na Campanha, no extremo sul. Uma pequena parte restante dos vinhos brasileiros é proveniente de diminutas regiões vitivinícolas situadas nos

estados de Minas Gerais (municípios de Andradas, Caldas, Poços de Caldas e Santa Rita de Caldas), Paraná (Colombo), Pernambuco (Santa Maria da Boa Vista e Santo Antônio), Santa Catarina (Urussanga), São Paulo (Jundiaí e São Roque) e o promissor Vale do rio São Francisco, especialmente na cidade de Santa Maria da Boa Vista, próxima de Petrolina e Juazeiro, na fronteira de Pernambuco e Bahia (MARASCHIN et.al., 2004)

O município de Colombo, na região metropolitana de Curitiba, produz 1,3 mil toneladas de uva por ano e 800 mil litros de vinho artesanal, segundo dados da Secretaria Municipal de Agricultura, Abastecimento e Meio Ambiente dessa localidade. É interessante ressaltar que a produção artesanal dos vinhos de Colombo ultrapassou significativamente a produção total de vinhos de mesa registrados no estado do Paraná, 570.773 litros, segundo dados do Ministério da Agricultura referentes ao ano de 2002. Desse total, 77,55% são de vinhos tinto de mesa, registrando um aumento de 43,69% de representatividade dos vinhos tintos em relação ao ano de 1999.

No entanto, essas regiões vitivinícolas cultivam quase que exclusivamente uvas americanas que originam apenas vinhos de categoria inferior. As uvas americanas são assim chamadas por terem sua origem na América do Norte e América Central, embora, posteriormente, tenham sido cultivadas em vários países pela técnica da enxertia. São mais resistentes que as viníferas, produzem maior quantidade de grãos, mas sua qualidade é muito inferior (baixo teor de açúcar e elevada acidez) entre as mais destacadas estão a Bordô, Concord, Herbemont e Isabel (PACHECO, 1999).

No Paraná, podemos destacar a uva Bordô (*V. labrusca*), de origem americana e conhecida em nosso Estado como Terci, sendo classificada como comum superior. Foi cultivada pela primeira vez em 1840 por Henry Ives em Ohio, Estados Unidos, justificando seu nome original como Ives ou Ives Seedling (CAMARGO, 1989, PACHECO, 1999).

A vitivinicultura brasileira, embora recente no Brasil, tem avançado tanto nos produtos elaborados como vinhos e sucos, quanto na produção de uvas para consumo *in natura*. Em 2003 foram produzidas 1.054.934 toneladas de uvas, sendo

o Rio Grande do Sul o maior produtor com 489.012 toneladas (TABELA 1). Além disso, em 2003, 40,38% da uva produzida no Brasil foi destinada à elaboração de vinhos, sucos, destilados e outros derivados (MELLO, 2003 (b)).

TABELA 1 – PRODUÇÃO DE UVAS NO BRASIL, EM TONELADAS

ESTADO / ANO	2003
Pernambuco	104.506
Bahia	87.435
Minas Gerais	13.455
São Paulo	224.468
Paraná	94.250
Santa Catarina	41.709
Rio Grande do Sul	489.012
Brasil	1.054.934

FONTE : MELLO, L.M.R. **Produção e comercialização de uvas e vinhos – panorama 2003.**

Disponível em < <http://www.cnpuv.embrapa.br> > Acesso em 25 jul. 2004.

Considerando-se que não se dispõe de dados estatísticos sobre a produção e comercialização nacional de vinhos, podem-se utilizar dados referentes ao Estado do Rio Grande do Sul para situar o vinho nacional.

Segundo o IBGE, a área de cultivo de uvas no Brasil no ano de 2003, foi de 68.323 hectares (TABELA 2), destacando-se novamente o Estado do Rio Grande do Sul como principal produtor, com 56,37% da área total do país. Embora a produção de vinhos, suco de uva e derivados da uva e do vinho também ocorra em outras regiões, a maior concentração está no Rio Grande do Sul, onde são elaborados, em média anual, 330 milhões de litros de vinhos e mostos, representando 95% da produção nacional (PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2003).

Ainda que sejam plantados mais de cem cultivares no Rio Grande do Sul, aproximadamente 20 são expressivos para elaboração de vinhos e sucos de uvas (MELLO, 2003 (b)).

TABELA 2 – ÁREA DE VIDEIRAS PLANTADAS NO BRASIL, EM HECTARES

ESTADO / ANO	2002	2003
Pernambuco	3.365	3.423
Bahia	2.732	2.911
Minas Gerais	950	903
São Paulo	12.152	12.398
Paraná	6.000	6.500
Santa Catarina	3.514	3.671
Rio Grande do Sul	36.668	38.517
Brasil	65.381	68.323

FONTE : MELLO, L.M.R. **Produção e comercialização de uvas e vinhos – panorama 2003.**

Disponível em < <http://www.cnpuv.embrapa.br> > Acesso em 25 jul. 2004.

A população brasileira está consumindo mais vinho e de melhor qualidade, devido a profundas alterações estruturais no parque vinícola brasileiro, fruto de esforços que permitiram um grau de evolução satisfatório em relação às exigências do mercado nacional. Aspectos como qualidade e preço são compatíveis com a dimensão do mercado e com as exigências da maioria dos consumidores. Entretanto, mesmo empenhando todos os esforços, a produção nacional de vinhos finos não supre a demanda interna. A participação dos vinhos importados em relação aos vinhos finos (de viníferas) comercializados no país representou 53,6% do total consumido, em 2003. Visando alcançar um mercado promissor, os produtores brasileiros descobriram que uma das maneiras de conseguir qualidade com produtividade é melhorar a base da viticultura: os vinhedos (MELLO, 2003 (a)).

O nível tecnológico atingido pelo setor agro-industrial nacional para vinhos finos é comparável ao existente nos países de avançada vitivinicultura. Todavia, contraditoriamente, mesmo utilizando tecnologias avançadas de vinificação, as cantinas não têm conseguido atingir os níveis de qualidade e produtividade esperados. Em decorrência disto, como estratégia para se alcançar este objetivo, decidiu-se por investir no cultivo da videira com maior tecnificação, o que já é realidade em algumas vinícolas do Sul do país. Todavia, o mesmo não se pode dizer para a tecnologia empregada na elaboração de vinhos de consumo corrente. Como consequência disso, os vinhos finos nacionais são considerados de boa qualidade, enquanto os vinhos de consumo corrente apresentam qualidade regular. Para estes

últimos, há maior necessidade de investimentos em tecnologia de produção, tanto da matéria-prima quanto no processamento (MELLO, 2000).

3.3 LEVEDURAS

3.3.1 Características gerais

As células de leveduras podem ser esféricas, ovais ou elípticas podendo ainda apresentar-se bastante alargadas. Porém, a forma da levedura não é indício

para identificação de espécies e nem a variedade de formas em um mesmo cultivo pode ser considerado contaminação do mesmo. As leveduras não possuem flagelo e, em consequência disso, são imóveis. Suas dimensões variam consideravelmente em função da espécie, nutrição e idade entre outros fatores. As leveduras caracterizam-se por uma forma de reprodução vegetativa conhecida como brotamento ou gemulação. A esporulação em leveduras é um fator importante por constituir a base de um método de reprodução, desempenhar uma função de produção de novos híbridos e por manter a viabilidade das espécies durante as variações do meio ambiente. Quanto à composição química das leveduras, elas apresentam de 68% a 83% de água além de substâncias nitrogenadas, carboidratos, lipídios, vitaminas, minerais entre outros. Assim como qualquer forma de vida, as leveduras necessitam de fatores físicos e químicos importantes indispensáveis para seu crescimento e reprodução. Alguns elementos são basicamente necessários, como água, fontes de carbono e nitrogênio, oxigênio e minerais (TORTORA; FUNKE; CASE, 2002).

Estudos demonstraram que as leveduras dependem de fontes de carbono orgânico para seu crescimento e obtenção de energia, sendo os carboidratos os nutrientes de maior importância. Alguns açúcares simples como a glicose, frutose e manose são assimiladas pela maioria das espécies estudadas, enquanto alguns oligossacarídeos, polissacarídeos, álcoois primários, polióis, ácidos orgânicos, pentoses, tetroses, hidrocarbonetos e lipídeos são utilizados seletivamente por

algumas espécies. O carbono pode ser fornecido às leveduras na forma de açúcar, aldeídos, sais de alguns ácidos orgânicos, glicerina ou etanol, e ocasionalmente de alguma outra forma, dependendo do tipo da levedura. Ao considerar os açúcares como fonte de carbono, é importante lembrar a diferença que existe entre a capacidade de uma levedura em assimilar um açúcar e sua capacidade de fermentar o mesmo açúcar (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997).

Diferenças na fermentação e assimilação de compostos de carbono são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras, pois estes microrganismos apresentam uma variação na habilidade de fermentação de açúcares. Alguns grupos apresentam fermentação vigorosa da glicose como *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspota* e *Zygosaccharomyces*, enquanto outros, como *Lipomyces* e *Sterigmatomyces* são estritamente não-fermentativos (WALT YARROW, 1984).

3.3.2 Importância econômica das leveduras

A importância industrial das leveduras vem se estendendo além da fermentação tradicional. Atualmente, os produtos da biotecnologia a partir de leveduras afetam muitos setores comerciais importantes, como as indústrias de alimentos, bebidas, biocombustíveis, produtos químicos, enzimas industriais, produtos farmacêuticos, produtos agrícolas e o ambiente. Tem-se a previsão de que a produção tradicional de álcool etílico, por indústrias cervejeiras, vinícolas, indústrias de bebidas destiladas e de combustíveis, e a produção de biomassa, pela indústria alimentícia, irão continuar a fornecer a maior quantidade de produtos fermentados do mundo. Esta suposição está baseada no fato de que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é responsável pela produção dos principais produtos de fermentação (em termos de tonelagem mundial por ano), isto é, 60 milhões de toneladas de cerveja, 30 milhões de toneladas de vinho, 800.000 toneladas de proteína microbiana (*SCP – single cell protein*) e 600.000 toneladas de fermento de pão (PRETORIUS; TOIT; RENSBURG, 2003).

O consumo de alimentos fermentados vem aumentando desde a década de 1970, e inclui alimentos como produtos lácteos (iogurtes, queijos, soro de leite), salsichas, bebidas fermentadas alcoólicas, vegetais, frutas, molhos, entre outros. Um dos motivos do aumento do consumo é que estes alimentos são considerados naturais e saudáveis (GIRAFFA, 2004).

Devido à importância econômica dos processos biotecnológicos envolvendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, quer na panificação, na produção de cerveja, vinho e outras bebidas alcoólicas ou ainda na produção de um combustível alternativo e renovável, tal microrganismo pode ser considerado o eucarioto mais estudado e cujo metabolismo é o mais conhecido (AQUARONE; LIMA; BORZANI, 2001).

3.3.3 *Saccharomyces cerevisiae*

O gênero *Saccharomyces* tem passado por inúmeras mudanças desde a sua descoberta, há 150 anos. Quando a primeira publicação sobre taxonomia de leveduras foi compilada por Guilliermond, em 1912, o gênero *Saccharomyces* compreendia 46 espécies divididas em 06 grupos separados de acordo com a atividade fermentativa sobre os açúcares. Em 1952, o número total de espécies deste gênero foi reduzido a 30, uma vez que várias espécies foram agrupadas como sinônimos em *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* variedade *elipsoideus*, *Saccharomyces carlsbergensis* ou *Saccharomyces willianus*, enquanto novas espécies foram introduzidas ao gênero. Entretanto, várias outras divisões ocorreram e outras novas espécies foram descritas, principalmente o grupo *Saccharomyces sensu stricto*, obtendo-se como resultado, em 1970, 41 espécies dentro do gênero *Saccharomyces*. WALT e YARROW³, citado por VAUGHAN-

³WALT, J.P. van der; YARROW, D. Methods for isolation maintenance, classification and identification of yeasts. In: KREGGER-VAN RIJ, NJW (Ed.). **The Yeasts: a taxonomy study**. Amsterdam: Elsevier Science, 1984.

MARTINI; MARTINI (1993), reduziram drasticamente o gênero *Saccharomyces* em 7 espécies. *Saccharomyces sensu stricto*, previamente com 21 espécies, tornou-se a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, e outras espécies previamente agrupadas por Van der Walt, em 1970, foram introduzidas a outros gêneros como *Zygosaccharomyces* e *Tolurasporea*. Esta classificação de Yarrow, mais tarde foi tanto confirmada por alguns autores, quanto contraditória segundo outros (VAUGHAN-MARTINI; MARTINI, 1993).

O gênero *Saccharomyces* vem tendo inúmeras mudanças taxonômicas ao longo dos anos. Atualmente, de acordo com a última revisão taxonômica, 14 espécies são aceitas dentro do gênero *Saccharomyces*, as quais estão classificadas em três grupos previamente estabelecidos por van der Walt.

O complexo *Saccharomyces sensu lato* inclui *Saccharomyces barnettii*, *Saccharomyces castellii*, *Saccharomyces dairenensis*, *Saccharomyces exiguus*, *Saccharomyces rosinii*, *Saccharomyces servazzii*, *Saccharomyces spencerorum*, *Saccharomyces transvaalensis* e *Saccharomyces unisporus*. O segundo grupo *Saccharomyces kluyveri*. O terceiro grupo, o qual inclui espécies de interesse biotecnológico, consiste do complexo *Saccharomyces sensu stricto*, compreendendo *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*, todos associados com fermentação industrial, e *Saccharomyces paradoxus*, a única espécie *Saccharomyces sensu stricto* tipicamente isolada a partir de habitat natural (insetos, árvores e exsudatos). Recentemente, três novas espécies isoladas a partir de habitat natural, *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzvi* e *Saccharomyces mikatae*, têm sido incluídas dentro do grupo *Saccharomyces sensu stricto* (QUEROL; BELLOCH, 2003 (b))

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo atrativo de se trabalhar por ser não-patogênico, e devido a sua longa história de aplicação na produção de produtos consumíveis como o etanol e o pão, ela foi classificada como *microrganismo geralmente considerado seguro* (GRAS – generally regarded as safe) (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000).

Além disso, os processos fermentativo e tecnológico bem estabelecidos para a produção em larga escala com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, fazem este

microrganismo ser bastante atrativo para muitos processos biotecnológicos. Outra importante razão para a aplicabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* dentro do campo da biotecnologia é a sua susceptibilidade a modificações genéticas pela tecnologia do DNA recombinante, que vem sendo bastante facilitado pela publicação, em 1996, do genoma completo da levedura (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000).

3.4 PROCESSO FERMENTATIVO

3.4.1 Fermentação Espontânea

As fermentações espontâneas são aquelas produzidas de maneira natural, ou seja, realizadas pelas leveduras provenientes das cascas das uvas, sem nenhum tipo de inoculação externa. Isto faz com que as fermentações espontâneas não sejam produto da ação de uma única espécie de levedura, e sim uma sucessão de espécies de leveduras diferentes ao longo da fermentação (TORIJA, 2002).

As leveduras podem ter a sua origem nas uvas e/ou no material que entra em contato com o mosto. Em uma uva sã e madura que seja prensada assepticamente, a população total de leveduras no mosto pode variar entre 10^3 – 10^5 unidades formadoras de colônias por mililitros de mosto (UFC/mL). Tradicionalmente, leveduras associadas a uvas são conhecidas pela fermentação de açúcares a etanol, gás carbônico e outros metabólitos secundários também de importância para o processo. A espécie majoritária na superfície do grão da uva é a levedura apiculada *Hanseniaspora uvarum* e sua forma anamórfica, *Kloeckera apiculata*, que representam aproximadamente entre 50 – 75% da população total. Juntamente com a *Candida*, elas dominam os primeiros estágios da fermentação espontânea, seguidas por muitas espécies de *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia* e *Pichia*, quando o nível de etanol aumenta de 3 para 4% (JIMENEZ-CLEMENTE, et. al., 2004; ROSINI, G., FEDERICI e MARTINI, 1982; PARISH, CARROL, 1985).

Assim, embora muitos gêneros e espécies de leveduras sejam encontrados no mosto de fermentação, o gênero *Saccharomyces*, e principalmente a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, é a principal responsável pela fermentação alcoólica (QUEROL et. al., 2003 (a)).

O estágio final da fermentação espontânea é, invariavelmente, dominado pelo grupo de leveduras álcool-tolerantes de leveduras *Saccharomyces sensu stricto*. Este grupo consiste de quatro espécies, a saber, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces paradoxus* e *Saccharomyces pastorianus*. Uma vez que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é encontrada quase que exclusivamente nos ambientes fermentativos e é universalmente preferida como iniciadora de fermentações, ela tornou-se conhecida como *levedura vínica*, sendo a principal responsável pela fermentação alcoólica. Entretanto, outras leveduras não-*Saccharomyces*, assim como espécies de *Bretanomyces*, *Schyzosaccharomyces*, *Torulaspota* e *Zygosaccharomyces*, também podem estar presentes durante a fermentação e podem ocorrer no vinho resultante (REDZEPOVÍC et. al., 2002).

As diferentes e dinâmicas atividades destas leveduras apresentam grande impacto sobre muitos aspectos no processo fermentativo vínico. Algumas espécies são benéficas para a produção do vinho; outras atuam prejudicialmente como microrganismos deteriorantes. A contribuição individual e coletiva destas leveduras selvagens varia de acordo com o número e diversidade de espécies presentes no mosto de fermentação (PRETORIUS, 2000).

3.4.2 Bioquímica da Fermentação

Na fermentação vínica, os principais açúcares presentes no mosto, glucose e frutose, são co-fermentados levando à produção de etanol e gás carbônico, assim como outros metabólitos de menor importância (BERTHELIS, 2004).

As leveduras do vinho durante a fermentação do mosto produzem, como resultado do seu metabolismo, uma grande variedade de compostos ao lado do etanol, o principal produto. Os principais fatores que afetam estes produtos são a espécie da levedura, o tipo de mosto e as condições de fermentação. Estes produtos são liberados durante a fermentação e contribuem para o sabor do vinho, de maneira que a qualidade do vinho depende do tipo destes compostos e suas concentrações. Estes compostos compreendem álcoois superiores, cetonas, aldeídos, ácidos graxos, acetatos e ésteres (MAURICIO, 1997).

A transformação do açúcar até resultar etanol e gás carbônico envolve 12 reações em seqüência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tais enzimas sofrem a ação de diversos fatores (nutrientes minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura, etc.) alguns que estimulam, outros que reprimem a ação enzimática, afetando assim o desempenho do processo. O objetivo primordial da levedura ao metabolizar o açúcar, é gerar uma forma de energia química (ATP) que será empregada na realização dos diversos trabalhos fisiológicos e biossínteses, necessários à manutenção da vida, crescimento e multiplicação, perpetuando desta forma a espécie. O etanol e CO₂ resultantes se constituem em produtos de excreção, sem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose. Entretanto, o etanol e outros produtos de excreção podem ser oxidados metabolicamente gerando mais ATP e biomassa, mas apenas em condições de aerobiose. Durante a fermentação, na seqüência de reações de produção de ATP, rotas metabólicas alternativas aparecem para propiciar a formação de materiais necessários à produção de biomassa (polissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos) bem como para a formação de outros produtos de interesse metabólico, relacionados direta ou indiretamente com a adaptação e sobrevivência, o que pode vir a reduzir a produção de etanol. São eles, o glicerol, os ácidos orgânicos, principalmente o succínico e o acético, que conjuntamente com a biomassa são quantitativamente os principais subprodutos metabolicamente relacionados ao equilíbrio redox celular em anaerobiose. A fermentação alcoólica é um processo não oxidativo, sem a participação do oxigênio molecular, e portanto, para se manter o equilíbrio de redox celular, todo o NADH formado (em reações de

oxidação) deve ser consumido (em reações de redução) estas acopladas à produção de etanol e glicerol (AMORIM; BASSO; ALVES, 1996).

3.4.3 Fatores que afetam o desempenho fermentativo

Obviamente, a fermentação alcoólica é fortemente afetada por alguns fatores como a clarificação do suco de uva, os níveis de dióxido de enxofre, a temperatura de fermentação e a composição do suco de uva entre outros. Um destes fatores, a temperatura de fermentação, afeta diretamente a flora microbiana do mosto e as reações bioquímicas das leveduras. Além disso, o número de diferentes espécies assim como suas resistências durante a fermentação alcoólica são condicionadas tanto pela temperatura do mosto quanto pela temperatura durante a fermentação. Estas alterações determinam química e organolepticamente a qualidade do vinho. A temperatura também afeta o metabolismo da levedura, e como resultado disso, a formação de metabólitos secundários como o glicerol, ácido acético e ácido succínico (TORIJA, et. al., 2003).

A temperatura mais adequada para a realização da fermentação alcoólica situa-se entre 18-23 °C e esta é a temperatura geralmente empregada para a elaboração de vinhos brancos. Para a elaboração de vinhos tintos é necessária uma maceração das bagas das uvas com a finalidade de se extrair compostos como antocianinas e taninos de forma que a fermentação seja então conduzida a temperaturas mais elevadas, entre 24 – 31 °C, para maior extração destes compostos. Acima de 33-35 °C o risco de término da fermentação é muito elevado assim como de contaminação bacteriana, uma vez que em temperaturas elevadas as membranas celulares das leveduras tornam-se menos seletivas, liberando substratos mais adequados para as bactérias (COLLADO, 2001).

A produção de glicerol também é outro fator que afeta o desempenho fermentativo, uma vez que parte do glicerol formado está acoplado à manutenção do equilíbrio redox intracelular. Como a biossíntese de glicerol utiliza o poder redutor (NADH), a produção do mesmo é aumentada quando há excesso de NADH na célula. Isto ocorre quando processos oxidativos se desenvolvem, sejam decorrentes

da produção de biomassa ou formação de ácidos orgânicos. Outros fatores como o ácido succínico, ácido acético, produção de biomassa e carboidratos de reserva também podem vir a afetar o desempenho da fermentação, uma vez que, ao serem produzidos ou consumidos, irão alterar o equilíbrio redox da célula (AMORIM; BASSO; ALVES, 1996).

Para a formação de um mol de succinato há conseqüentemente formação de 5 moles de NADH (reduzido). Para se restabelecer o equilíbrio redox da célula é necessário consumo deste NADH, que é feito através da produção do glicerol. A produção de um mol de glicerol consome um mol de NADH. Para a formação de um mol de ácido acético ocorre a produção de dois moles de NADH (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997).

3.5 USO DE LEVEDURAS SELECIONADAS

O conceito de inoculação em fermentações vínicas com culturas puras como iniciadoras datam de 1890 quando Muller-Thurgau convenceu alguns alemães vinicultores do benefício concomitante do ritmo e rapidez da fermentação. Cerca de 75 anos depois, duas leveduras comerciais secas ativas foram produzidas e oferecidas a todo o mundo como leveduras para todos os propósitos. Seu sucesso foi limitado e logo se percebeu a necessidade de separar leveduras *Saccharomyces cerevisiae* com características específicas para diferentes tipos e estilos de vinhos. Os produtores de vinhos utilizam culturas iniciadoras com ampla variação de propriedades fermentativas, tecnológicas e metabólicas especializadas, como por exemplo: rápida iniciação do processo fermentativo, alta tolerância a etanol, osmotolerância, baixa produção de biomassa, alta estabilidade genética, baixa formação de espuma, pouca quantidade de sulfeto de hidrogênio, entre outros (PRETORIUS, 2000). Estas leveduras também devem ter outras características desejáveis como tolerância ao dióxido de enxofre, habilidade de fermentar açúcares eficientemente a uma concentração em torno de 20% (p/v) e produzir grandes quantidades de glicerol (CARRASCO; QUEROL, 2001).

No caso de fermentações de vinho conduzidas por leveduras secas ativas, a principal levedura responsável pela fermentação é a levedura inoculada no processo, mas isto não diminui significativamente o desenvolvimento de leveduras naturais durante os primeiros estágios da fermentação, as quais têm um importante efeito no sabor do vinho (GONZÁLEZ-PEREZ, et. al., 1993).

Atualmente, na maioria das vinícolas, são utilizadas leveduras selecionadas as quais são inoculadas no mosto de fermentação como leveduras secas ativas, simplificando microbiologicamente o processo de fermentação alcoólica. A levedura inoculada é geralmente responsável pela fermentação e constitui a maioria da população de levedura ao final do processo. Esta prática de inoculação de leveduras tem algumas vantagens como a diminuição da fase lag, redução significativa da influência de leveduras que naturalmente ocorrem, rápida e completa fermentação do mosto e ainda permite um alto grau de reprodutibilidade de produção do vinho (ZUZUARREGUI; OLMO, 2004 (b)).

Tecnologistas do vinho definem as qualidades requeridas para a definição de levedura *Saccharomyces cerevisiae* como “iniciadora seletiva para elaboração de vinho” em duas categorias: primárias, àquelas estruturalmente associadas à formação do etanol pela fermentação; e secundárias, àquelas relacionadas à produção de compostos que afetam outros parâmetros como o corpo do vinho, o buquê e o aparecimento de sabores desagradáveis. Convencionalmente, as condições primárias envolvem o alto vigor fermentativo, ou seja, a alta concentração de etanol obtida a partir de grandes quantidades de açúcares; a alta pureza fermentativa, que expressa a relação entre a acidez volátil (em g de ácido acético/l) e etanol (% volume) ao final do processo fermentativo e a alta taxa fermentativa, a qual mede a capacidade de uma levedura em completar rapidamente o processo fermentativo. Esta é representada em gramas de gás carbônico desenvolvidas no período de 24 horas, calculadas como a média medições em 3 dias consecutivos. As condições secundárias afetam outro nível de qualidade do vinho, ou seja, as características organolépticas, as quais são mais difíceis de serem representadas em termos analíticos devido ao fato de que resultam das interações de inúmeros sub-produtos da fermentação primária (MARTINI, 2003).

O uso de leveduras selecionadas no processo de produção do vinho requer o desenvolvimento de técnicas que possam claramente diferenciar as leveduras inoculadas do restante das leveduras selvagens presentes no mosto. Isto irá proporcionar um conveniente teste para assegurar que a fermentação está sendo conduzida pelas leveduras inoculadas. Como a maioria das leveduras pertence à mesma espécie, *Saccharomyces cerevisiae*, elas não podem ser diferenciadas pelos métodos clássicos microbiológicos. Para resolver este problema, muitas técnicas baseadas em polimorfismos moleculares têm sido utilizadas recentemente para caracterização de leveduras de vinhos (TORRIANI et.al., 2004).

O melhoramento genético, baseado em técnicas genéticas clássicas (mutagênese, hibridização, fusão de protoplastos) aliado posteriormente à biologia molecular, aumentou substancialmente as possibilidades de modificar leveduras industriais em função das características desejáveis no produto final. Nos últimos 20 anos, os principais alvos para o desenvolvimento de diferentes variedades de *Saccharomyces cerevisiae* estão voltados para o melhoramento da *performance* fermentativa e simplificação do processo, aliado ao aumento da qualidade do produto, como as características sensoriais e higiênicas (VILANOVA et. al., 2000; DEQUIN, 2001).

Há considerável controvérsia sobre uso de leveduras puras selecionadas em fermentações vínicas. Segundo QUEROL; JIMENEZ; HUERTA (1990), na fermentação natural, uma sucessão de gêneros de leveduras é observada durante os primeiros estágios do processo, seguido de certas espécies de *Saccharomyces*, as quais então dominam os estágios mais ativos até o final da fermentação. Sugere-se que esta sucessão de espécies permite a obtenção de um aroma mais complexo do vinho. Alguns pesquisadores alegam que o uso de leveduras selecionadas pode suprimir significativamente o desenvolvimento de leveduras naturais durante a fermentação. Por outro lado, HEARD e FLEET (1985) postularam que as variedades de *S. cerevisiae* inoculadas podem influenciar benéficamente o desenvolvimento de variedades de *Saccharomyces* selvagens pela inibição do crescimento de leveduras não-*Saccharomyces*.

3.6 IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DE INTERESSE ENOLÓGICO

Um dos avanços chave da enologia moderna é o reconhecimento da importância da levedura como um agente imprescindível para a adequada obtenção do vinho. Deste reconhecimento nasce, de maneira imediata, a necessidade de controlar as propriedades metabólicas e genéticas das leveduras empregadas nos processos fermentativos enológicos, assim como de desenvolver sistemas analíticos capazes de distinguir entre as diferentes leveduras, tanto pelas desejadas quanto pelas contaminantes.

PHAFF¹, citado por MATIENZO (2002), afirmou que o crescimento em temperaturas elevadas, em meios com altos teores de açúcares ou cloreto de sódio, o requerimento de vitaminas, a susceptibilidade a certas drogas como a ciclohexamida e a produção de determinados metabólitos são critérios utilizados na descrição e classificação das leveduras, e são importantes, uma vez que auxiliam no agrupamento das linhagens de acordo com o habitat da levedura.

Segundo KRIEGER-VAN RIJ², também citado por MATIENZO (2002), as metodologias aplicadas à identificação de leveduras envolvem procedimentos como o isolamento da levedura do ambiente, determinação de propriedades morfológicas e fisiológicas, descrição e comparação com microrganismos padrão e ocasionalmente, avaliação de propriedades tecnológicas.

O conjunto de dados obtidos, obedecendo rigorosamente a protocolos padronizados, resulta na identificação e posicionamento taxonômicos das leveduras. Além disso, a classificação ideal deve estar baseada na filogenia dos microrganismos, uma vez que a relação classificação-filogenia permite predizer similaridades genéticas entre os microrganismos, fornecendo informações necessárias para a descoberta e avaliação de parentescos entre linhagens e

¹ PHAFF, H.J. Isolation of yeasts from natural sources. In: LABEDA, D.P. (Ed.). **Isolation of biotechnological organisms from nature**. New York: McGraw-Hill, 1990.

² KRIEGER-VAN RIJ, N.J.W. Classification of yeasts. In: ROSE, A.H.; HARRISSON, J.S. (Ed.). **The Yeasts**. London: Academic Press, v.1, 1987

espécies, resultando em maior compreensão da evolução das leveduras (MATIENZO, 2002).

Atualmente existem vários métodos de identificação de leveduras de interesse enológico. O maior desafio ao se identificar leveduras recai na necessidade de diferenciar gêneros e espécies que taxonomicamente estão muito próximos, mas que têm propriedades muito diferentes no que se refere às suas características fermentativas e organolépticas. Durante as primeiras fases da fermentação vínica aparecem no mosto as leveduras dos gêneros *Kloeckera*, *Candida*, *Rhodothorula*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, entre outras. A presença destas espécies pode dar lugar a metabólitos secundários que modificam as propriedades organolépticas do produto final, e, portanto, é importante dispor de métodos eficazes de detecção para seu controle. Finalmente, também é possível utilizar as técnicas de identificação molecular para as análises e comprovação da estabilidade genética das leveduras, um aspecto importante quando se manejam grandes volumes de cultivo (CARRO; PIÑA, 2000).

A dificuldade de identificação de leveduras pela utilização de técnicas microbiológicas usuais, tem induzido o desenvolvimento de um grande número de diferentes caminhos taxonômicos. A biologia molecular tem providenciado novas técnicas para a determinação taxonômica de leveduras vínicas. Estas técnicas incluem a análise de restrição do DNA genômico e mitocondrial, cariótipo molecular com eletroforese de campo pulsado e a reação em cadeia da Polimerase (PCR). A caracterização de espécies de leveduras a partir de PCR utilizando iniciadores específicos vem sendo adotada (SABATÉ; GUILLAMON; CANO, 2000).

Recentemente, uma variante da técnica de PCR, a RAPD-PCR (Reação em cadeia da polimerase - análises de Polimorfismo de DNA amplificado ao Acaso) tem sido aplicada ao estudo das leveduras. A RAPD-PCR baseia-se na amplificação seletiva de seqüências que, ao acaso, são circundadas por regiões complementares ao iniciador escolhido arbitrariamente. Os iniciadores têm seqüência específica, mas escolhida arbitrariamente. Esta técnica está baseada na utilização de iniciadores curtos, geralmente cerca de 10 nucleotídeos, que em temperatura baixa de anelamento hibridizam em regiões distribuídas aleatoriamente ao longo do genoma,

permitindo a amplificação de fragmentos de DNA cujas extremidades sejam complementares ao iniciador. Os produtos da reação são analisados por eletroforese. Esta técnica tem a vantagem adicional de que nenhum conhecimento específico do genoma a ser amplificado é necessário (QUESADA; CENIS, 1995).

Diferenças no padrão de amplificação refletem polimorfismos que se acumularam durante a evolução, sendo a RAPD-PCR útil para mapeamento genético, taxonomia, filogenética e para detecção de mutações (WELSH; RALPH; McCLELLAND, 1995).

Um dos problemas da técnica de RAPD-PCR, freqüentemente citado, é a sua reprodutibilidade. Existem muitas variáveis dentro da reação que contribuem para isto; dentre os mais importantes estão o termociclador utilizado, a DNA-polimerase, a concentração de DNA, seqüência de nucleotídeos dos iniciadores empregados e a composição do tampão utilizado (QUESADA; CENIS, 1995).

3.7 SELEÇÃO DE LEVEDURAS

Uma vez que linhagens de leveduras isoladas de produções artesanais mostram-se bem adaptadas às condições ambientais encontradas nas dornas de fermentação, a simulação destas condições é utilizada como critério para seleção de leveduras (PATARO et. al., 2000).

Durante a fermentação alcoólica as células de leveduras são submetidas a diversas condições de estresse e, desta maneira, têm que desenvolver mecanismos moleculares para que resistam a estas situações adversas. Qualquer fator do meio que possa vir a produzir um efeito adverso sobre o crescimento celular é considerado uma condição de estresse e a sobrevivência celular depende da sua habilidade em se adaptar rapidamente às mudanças do meio (IVORRA; PÉREZ-ORTIN; OLMO, 1999).

As células de leveduras possuem sistemas para sentir e responder às condições de estresse. Tanto o dano provocado pelo estresse quanto a resposta da levedura ao mesmo, depende do tipo e grau do estresse e o estado de desenvolvimento que se encontra a levedura no momento do estímulo. Em geral, as

condições adversas que as leveduras enfrentam afetam principalmente as estruturas celulares, como as membranas, e as diferentes macromoléculas, especialmente os lipídios, proteínas e ácidos nucléicos, os quais sofrem modificações estruturais que afetam seu funcionamento (FOLCH-MALLOL; GARAY-ARROYO; LLEDIAS, 2004).

Estes sistemas de resposta envolvem a rápida síntese de moléculas de proteção e a ativação de sinais que induzem eventos secundários como o engatilhamento de atividades enzimáticas pré-existentes e a transcrição de genes que codificam para fatores de proteção. As diferentes habilidades que as leveduras apresentam de resistir às condições de estresse durante a produção de vinho, podem determinar suas propriedades fermentativas e estabelecer critérios para a seleção de futuras leveduras de vinhos (IVORRA; PÉREZ-ORTIN; OLMO, 1999; CARRASCO; QUEROL, 2001).

Existem muitos tipos de condições de estresse que afetam as leveduras durante o processo de fermentação vínica.

O estresse térmico é uma condição que vem sendo largamente estudada. Nos processos artesanais, onde não há controle de temperatura, a temperatura de fermentação é importante porque afeta diretamente os microrganismos presentes e o metabolismo das leveduras (TORIJA et. al., 2003). Embora a condição de temperaturas elevadas não seja usualmente encontrada durante a fermentação, em virtude dos sistemas de controle de temperatura utilizados nos dias de hoje, altas temperaturas podem ocorrer durante o processo de produção de biomassa e secagem das leveduras, estágios requeridos para a preparação industrial de leveduras vínicas (FOLCH-MALLOL; GARAY-ARROYO; LLEDIAS, 2004).

O estresse hiperosmótico é uma condição de estresse importante para as leveduras vínicas, pois a alta concentração de açúcares no mosto de fermentação produz um estresse osmótico nas células da levedura ao qual elas devem resistir para conduzirem eficientemente a fermentação. Uma condição de estresse hiperosmótico se define como uma diminuição no potencial hídrico do ambiente no qual se está desenvolvendo o microrganismo. A resposta imediata é uma saída de água intracelular, seguida de um processo adaptativo amplo a fim de levar a um ajuste osmótico. Devido ao movimento de água, as concentrações intracelulares de íons e

biomoléculas aumentam resultando em diminuição da atividade celular; uma vez que o microrganismo se adaptou, retoma o crescimento (FOLCH-MALLOL; GARAY-ARROYO; LLEDIAS, 2004).

Um dos aspectos da resposta ao estresse osmótico inclui o aumento da produção e retenção intracelular do glicerol, que parcialmente envolve o aumento da expressão do gene que codifica para a enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase. Leveduras osmotolerantes são aptas a reter o glicerol sintetizado para atuar como um soluto compatível ou osmoregulador. Qualquer que seja o mecanismo, a habilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em resistir a condições hiperosmóticas de estresse irá depender tanto da produção quanto da retenção intracelular de glicerol (MYERS; LAWLOR; ATTFIELD, 1997).

A biossíntese e acúmulo de glicerol têm relevância comercial nos processos fermentativos para produção de cerveja e vinho, e também é importante para bebidas como saquê que tem neste composto um fator importante para suas características organolépticas (OMORI et. al., 1995; MAGER e SIDERIUS, 2002)

Durante a fermentação ocorre um aumento da concentração de etanol e, desta maneira, as leveduras precisam desenvolver um mecanismo para proteger-se da toxicidade desta molécula. Isto tem mostrado que o etanol induz um estresse aquoso nas leveduras vínicas (IVORRA; PÉREZ-ORTIN; OLMO, 1999).

Para a seleção de leveduras é essencial estabelecer suas propriedades enológicas. Existem diferentes critérios de seleção que podem ser divididos em: favoráveis, como tolerância ao etanol, bom rendimento na transformação dos açúcares em etanol, capacidade de crescer em altas concentrações de açúcares; e desfavoráveis, como a produção de sulfeto de hidrogênio, produção de espuma e acidez volátil (ESTEVE-ZARZOZO, et. al., 2000).

Quando se deseja selecionar uma levedura *Saccharomyces cerevisiae* para utilizá-la como iniciadora de um processo fermentativo e parte-se de um número elevado de leveduras diferentes, pode-se aplicar o que é conhecido como seleção massiva por competição. Este método de seleção é similar ao que ocorre nas fermentações espontâneas, e se baseia na própria competição entre as leveduras pelos nutrientes do meio de cultivo, para eleger aquelas que tenham melhor capacidade

fermentativa. Este critério pode ser suficiente, mas há necessidade de se utilizar outros métodos como, por exemplo, a temperatura de fermentação, a finalização correta do processo e as análises organolépticas dos vinhos produzidos (TORIJA, 2002).

Entre as propriedades enológicas mais importantes que devem estar presentes em uma levedura vínica estão o completo e rápido consumo de açúcar do mosto com contínua transformação destes açúcares em etanol; a não produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S); a alta capacidade de floculação principalmente ao final da fermentação; a alta tolerância ao dióxido de enxofre (SO₂) e ao etanol e a resistência a altas pressões osmóticas e capacidade da cepa em degradar substâncias pécticas (IRANZO; BRIONEZ-PÉREZ; IZQUIERDO-CAÑAS, 1998).

Segundo FINN e STEWART (2002), a floculação pode ser definida por uma agregação de células de leveduras em grumos, dispersáveis por ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou por açúcares específicos, e que podem ser removidos do meio. A floculação tem considerável importância na indústria cervejeira, uma vez que diminui custos, produz um meio com características desejáveis ao processo, e é um efetivo caminho para separar as leveduras do produto. Mesmo quando a centrifugação é aplicada no processo de fabricação para retirar as células suspensas; a floculação é importante para a remoção das leveduras (JIN e SPEERS, 1998; VERSTREPEN et. al., 2001; FINN e STEWART, 2002).

Microbiologistas têm proposto algumas hipóteses para explicar os mecanismos de floculação, como a teoria coloidal e a ponte de cálcio. Estudos mais recentes apontam para a teoria da *lectina-like*. As lectinas (ou zymolectina, como são conhecidas nas leveduras), são proteínas da parede celular que reconhecem e aderem à carboidratos (α -mananas) da superfície das células vizinhas. O cálcio é um importante co-fator nessas ligações (JIN et. al., 2001; FINN e STEWART, 2002).

Outras variações de parâmetros que ocorrem durante a fermentação também influenciam na floculação: pH, agitação e na presença de açúcares. Na floculação há participação do controle genético e molecular do processo (JIRANECK; LANGRIDGE; HENSCHKE, 1995).

O aroma e o sabor são parâmetros fundamentais na qualidade sensorial de alimentos e bebidas. Estudos sugerem que aproximadamente 10% dos compostos voláteis de alimentos e bebidas apresentam grupos contendo enxofre e, em alguns casos a presença de um único composto é suficiente para dar identidade a um produto. Os grupos contendo enxofre têm grande impacto no aroma do vinho, sendo classificados em cinco diferentes famílias de acordo com a sua estrutura: sulfídricos, tioéster, tióis, polisulfídricos e heterocíclicos. As diferentes concentrações destes compostos podem influir na produção de odores agradáveis ou desagradáveis. Compostos como a cistina, cisteína, metionina, glutatona e algumas vitaminas formam diferentes compostos contendo enxofre. Estas conversões podem ocorrer enzimaticamente como produtos da fermentação, ou não enzimaticamente, devido à ação da luz, temperatura ou outras reações dos compostos de enxofre durante a fabricação e a estocagem do vinho (MESTRES; BUSTO; GUASCH, 2000).

Devido ao odor repugnante a presença de sulfeto de hidrogênio é totalmente dispensável nas bebidas. Na fermentação da cerveja, o sulfeto de hidrogênio produzido pelas leveduras é removido durante a fermentação (RIBEIRO e HORII, 1999).

As enzimas pécticas de grande interesse na viticultura são as poligalacturonases e liases. Quando não produzidas pela cepa, estas enzimas podem ser adicionadas separadamente ao mosto. Entretanto, as preparações comerciais encontram-se geralmente contaminadas com arabinofuranidases e pectinesterases, que produzem e liberam metanol no mosto (BLANCO et al., 1997).

As enzimas pécticas degradam as substâncias pécticas do mosto, aumentando a taxa de clarificação e evitando o desaparecimento de substâncias importantes tais como as antocianinas e alguns outros precursores (IRANZO et al., 1998). Facilita a compressão das uvas, aumenta a extração de substâncias que contribuem na cor e aroma durante o tempo em que o mosto permanece em contato com as cascas, além de melhorar a filtração dos vinhos em função da diminuição na viscosidade (FERNÁNDEZ; ÚBEDA; BRIONES, 2000).

Além disto, aumenta a extração dos pigmentos e a velocidade do processo fermentativo. A economia no tempo de fermentação pode variar entre 30-50%.

Também reduzem a extração de ácido tânico e aumentam a maturação da uva. Aumenta a quantidade de açúcares fermentáveis, aumentando o rendimento do processo (WARD, 1985).

Nem todas as cepas de *S. cerevisiae* apresentam a habilidade de produzir enzimas pécticas. BLANCO et al. (1997) determinou que apenas 75% de suas cepas de *S. cerevisiae* tinham esta habilidade. IRANZO et al. (1998) determinou que apenas 33% de suas cepas de *S. cerevisiae* mostraram a capacidade de hidrolisar o ácido poligalacturônico. Além disso, *S. cerevisiae* não é reconhecido como um grande produtor de enzimas extracelulares, embora alguns trabalhos indiquem a degradação de poligalacturonatos (STRAUSS et al., 2001).

3.8 Elaboração de Vinho Tinto

A metodologia de elaboração para vinhos tintos descrito por CHOCIAI et. al., 2000 e DORNELES, 2003.

A metodologia de elaboração para vinhos tintos utilizada pela maioria dos vinicultores na região metropolitana de Curitiba segue o sistema clássico de vinificação conforme descrito por PATO, 1978; MENEGUZZO, 1990; CHOCIAI et.al., 2000.

Após a colheita das uvas, é realizada a lavagem e seleção dos bagos maduros e saudáveis, desengaçamento utilizando maquinário apropriado e os grãos são mecanicamente esmagados para liberação da polpa e sumo. O suco de uva obtido e são realizadas correções no mosto como correção da maturação da uva pela adição de açúcar (processo chamado chaptalização) ou com o mosto concentrado, ou ainda diminui-se a acidez por desacidificação. Por outro lado, quando a uva acusa acidez insuficiente, efetua-se a acidificação com ácido tartárico. Em seguida é realizada a sulfitação que consiste na adição de anidrido sulfuroso, na forma de metabissulfito de potássio, visando evitar o crescimento de microrganismos indesejáveis na fermentação. Realizadas as correções, o mosto juntamente com as cascas é levado para as cubas de fermentação, abertas ou fechadas.

A fermentação alcoólica ocorre em duas fases distintas: a primeira, rápida e tumultuosa, é aquela que se efetua logo após a vindima, durante poucos dias; a segunda fase, denominada complementar, realiza-se mais suavemente, durante mais tempo que a primeira.

A fermentação tumultuosa inicia-se pela transformação dos açúcares fermentáveis em álcool etílico e gás carbônico. O gás carbônico provoca a formação do “chapéu”, sendo necessário misturar este chapéu com o suco em fermentação, com auxílio de misturadores, ou em caso de grandes tanques, com auxílio de bombas, processo conhecido como remontagem e que consiste em bombear o mosto da parte inferior sobre o chapéu, pelo menos três vezes ao dia. No término desta fase, que está relacionado à diminuição na intensidade de desprendimento de gás carbônico, o bagaço do suco parcialmente fermentado é separado, processo conhecido como descuba.

Com a descuba, inicia-se a fase complementar da fermentação alcoólica, onde os açúcares que não foram fermentados são lentamente e totalmente transformados em álcool e onde serão formadas as substâncias responsáveis pelo aroma e buquê do vinho. O gás carbônico formado borbulha em um batoque hidráulico adaptado ao recipiente de fermentação para evitar o contato com o oxigênio durante a fase complementar. Quando cessa o borbulhamento é realizada a primeira trasfega com o objetivo de separar o vinho das substâncias sólidas acumuladas no fundo do recipiente (leveduras, cremor tártaro e outros constituintes que podem vir a alterar o vinho).

O vinho transferido para outro recipiente devidamente limpo e desinfetado inicia a maturação. O volume do recipiente é totalmente preenchido para evitar contaminação por bactérias. No final do período de maturação é realizada a segunda trasfega para continuar a separar o material indesejável que precipita no fundo do recipiente. Em seguida ocorre a estabilização, terceira trasfega, clarificação, filtração e engarrafamento dos vinhos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Relação de matérias utilizados nos experimentos e sua procedência:

- a) meios de cultura, soluções e reagentes obtidos da Merck do Brasil, Difco, Riede-de-Haën e Invitrogen;
- b) Leveduras comerciais *Saccharomyces cerevisiae* variedade *cerevisiae* (CK) e *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus* (BC), na forma seca ativa, proveniente do fabricante Danster Ferment AG, localizado na Suíça; e as leveduras *Schyzosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces marxianus*, *Phaffia rhodozyma*, adquiridas da *American Type Culture Collection*.
- c) Iniciadores SC1, SC2, OPB-01, OPB-10, OPB-12, OPB-14, OPX-01, OPX-03, OPX-06, OPX-07, ABI-15 e P-20, sintetizados Invitrogen Brazil Ltda;
- d) Marcadores de tamanho molecular 1 kb Plus DNA Ladder e 100 pares de base (pb) DNA Ladder, fornecedor Invitrogen Brazil Ltda.

4.2 MÉTODOS GERAIS

Métodos gerais utilizados nos experimentos:

- a) as medidas de pH foram realizadas em aparelho Micronal, modelo B-374 (Departamento de Farmácia, UFPR);
- b) as medidas de massas foram realizadas em balança digital analítica GEHAKA modelo AG 200 (Departamento de Farmácia, UFPR);
- c) microscopia, em microscópio ótico modelo Olympus CX 41 (Departamento de Farmácia, UFPR);
- d) as contagens de células foram feitas em câmara de Neubauer (CARVALHO, 1994).
- e) os procedimentos de sementeiras dos microrganismos, extração de DNA e preparo das reações de PCR e RAPD foram realizadas em fluxo laminar TROX do Brasil, modelo FLV classe I (Departamento de Farmácia, UFPR);

- f) a determinação espectrofotométrica foi efetuada em aparelho espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu modelo UV-1601PC (Departamento de Farmácia, UFPR);
- g) as centrifugações foram realizadas em centrífuga Janetzk, modelo T-23 (Departamento de Farmácia, UFPR) e centrífuga Eppendorf, modelo 5410 (Departamento de Patologia Médica, UFPR);
- h) as esterilizações dos materiais foram feitas em autoclave Phoenix (Departamento de Farmácia, UFPR), a 1 atm de pressão e a 121°C durante 20 minutos;
- i) as esterilizações dos meios de cultivo, soluções e tampões foram feitas em autoclave Fabbe, modelo 103 (Departamento de Farmácia, UFPR), durante 40 minutos sob vapor fluente;
- j) as incubações foram feitas em estufa microbiológica Fabbe, BOD Tecnal modelo TE-391 (Departamento de Farmácia, UFPR);
- k) incubação, em incubadora com agitação orbital Marconi, modelo MA-420 (Departamento de Farmácia, UFPR) a 30°C e 150 rotações por minuto (rpm);
- l) As soluções utilizadas nos ensaios de biologia molecular foram preparadas como descrito por SAMBROOK; FRITSCH; MANIATTIS (1989) e XUFRE, et. al., 2000.
- m) as reações de PCR e RAPD foram realizadas em aparelho termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Departamento de Patologia Médica, UFPR);
- n) as eletroforeses foram feitas em cubas Horizon[®] 58 – Life Technologies (Departamento de Patologia Médica, UFPR);
- o) os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio, observado em transiluminador de luz ultravioleta Ultra-Lum, modelo EB-20E. Os géis foram fotografados com câmara digital Sony Cyber Shot P-100 (Departamento de Patologia Médica, UFPR);

- p) os cromatogramas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram obtidos em aparelho Shimadzu modelo LC-10AVP, módulo RID 10-A (Detector de Índice de Refração), coluna Phenomenex Rezek ROA-Organic Acid OOH-0138-KO, tamanho 300 x 7.8mm (Departamento de Farmácia, UFPR).

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Carboidratos totais

Os carboidratos totais foram determinados pelo método Oficial de Eynon-Lane, descrito na Portaria n. 076, de 27 de novembro de 1986 do Ministério da Agricultura.

4.3.2 Método turbidimétrico

A avaliação da concentração celular foi feita por turbidimetria, após diluição adequada de uma alíquota das suspensões de células, com água destilada estéril, de modo a obter a densidade ótica (DO) não superior a 0,60 de absorbância (onde há linearidade entre a densidade ótica e a concentração celular) a 650 nm (SLININGER et al., 1982).

4.4 COLETA DAS AMOSTRAS PARA ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS

Para o isolamento das leveduras vínicas os cachos de uvas foram coletados no mês de janeiro de 2003 em diferentes regiões dos vinhedos, previamente demarcadas, localizados no município de Colombo e colocados em sacos plásticos esterilizados. Os sacos plásticos foram acondicionados em gelo e transportados até o laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações.

Os sucos das uvas e as amostras provenientes de diferentes fases da fermentação foram coletados em frascos de vidro limpos e estéreis, pelos produtores de vinho de cantinas localizadas no município de Colombo- Paraná.

As amostras de vinhos safra 2003 e as coletas realizadas pelos vinicultores foram transportadas em caixas de isopor e encaminhadas ao laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações pela Secretaria da Agricultura, Abastecimento e Meio Ambiente do Município de Colombo.

4.5 MEIOS DE CULTURA

4.5.1 Meio YP (meio básico)

O meio de cultura básico apresenta a seguinte composição:

Extrato de levedura.....	1,0 g
Peptona.....	1,0 g
Água destilada.....	qsp 100 ml

O meio básico de cultura foi utilizado nos experimentos com variáveis na fonte de carbono e concentração: glicose 2 g% (p/v), sacarose 2 g% (p/v), galactose 2 g% (p/v), maltose 2 g% (p/v), rafinose 2 g% (p/v), manitol 2 g% (p/v), lactose 2 g% (p/v), celobiose 2 g% (p/v), xilose 2 g% (p/v), glicose 20 g% (p/v), sacarose 20 g% (p/v) sem e com adição de 8% (v/v) de etanol.

A este meio com 2 g% (p/v) de glicose, também foram adicionados antibióticos e solução aquosa de ácido tartárico 10 g% (p/v) estéril para os experimentos de isolamento das leveduras.

Nos experimentos onde foram usados os antibióticos (eritromicina e cloranfenicol) e o etanol, os mesmos não sofreram nenhum processo de esterilização e foram adicionados no momento do plaqueamento.

4.5.2 Meio YNB (Yeast Nitrogen Base – DIFCO®)

O meio Yeast Nitrogen Base (DIFCO Laboratories) foi preparado conforme indicado pelo fabricante. As fontes de carbono utilizadas foram: glicose, sacarose, galactose, maltose, rafinose, manitol, lactose, celobiose e xilose.

4.5.3 Meio YCB (Yeast Carbon Base – DIFCO®)

O meio Yeast Carbon Base (DIFCO Laboratories) foi preparado conforme indicado pelo fabricante. As fontes de nitrogênio utilizadas foram: nitrato de potássio, nitrito de sódio e lisina.

4.5.4 Meio Agar LA (ONO, et.al., 1991)

O meio Agar LA é composto por:

Glicose.....	4 g
Extrato de levedura.....	0,5 g
Peptona.....	0,3 g
Sulfato de amônio.....	0,02 g
Acetato de chumbo neutro.....	0,1 g
Agar	2,0 g
Água destilada.....	qsp 100 ml

Os meios descritos nos itens 4.5.1 a 4.5.4 foram preparados separando-se a fonte de nitrogênio da fonte de carbono. Para isso, a fonte de nitrogênio foi dissolvida em erlenmeyer contendo uma porção da água destilada a ser empregada no meio. A fonte de carbono utilizada foi dissolvida em outro erlenmeyer contendo o restante da água destilada e a este frasco quando necessário foram acrescentados 2 g% de ágar para tornar o meio sólido. Os frascos foram esterilizados em autoclave sob vapor fluente durante 40 minutos e em seguida e assepticamente procedeu-se à

mistura e posterior distribuição em placas estéreis, tubos ou erlenmeyers dependendo do experimento.

Quando necessário o pH do meio de cultura foi corrigido para 5,5, com solução de hidróxido de sódio 2 M.

4.6 ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS

Os grãos de uva, com auxílio de uma pinça foram colocados em contato, em forma de zigue-zague, com o meio sólido YP suplementado com 2 g% (p/v) de glicose (YPG 2%) contido em placas de Petri. Em seguida as placas foram colocadas em estufa a 30 °C durante 72 horas.

Para a obtenção das leveduras provenientes do suco das uvas e das amostras coletadas em diferentes fases da fermentação vínica, estas amostras foram semeadas em placa de Petri contendo meio sólido YPG 2% de maneira que 1 ml de cada amostra foi assepticamente colocado no centro da placa e espalhado com auxílio de alça de Drigalski (espalhadores). As placas foram deixadas em estufa a 30 °C durante 72 horas. Em seguida, em virtude de que não foram obtidas colônias isoladas, foram realizadas diluições em série destas amostras (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}) e 1 ml de cada diluição foi assepticamente transferida para o centro da placa contendo meio sólido YPG 2%, procedendo-se à semeadura com os espalhadores. Para cada diluição foram empregadas três placas de Petri contendo o meio YPG 2%.

As colônias isoladas crescidas, com características macroscópicas e microscópicas de levedura foram semeadas, com auxílio de uma alça estéril, por esgotamento em placas de Petri contendo meio sólido YPG 2% adicionado do antibiótico eritromicina na concentração de 30 µg/ml de meio. As placas foram colocadas em estufa a 30 °C durante 72 horas.

Visando a obtenção de leveduras puras, as colônias isoladas crescidas após observação em microscópio, utilizando técnica a fresco, foram semeadas em placas de Petri contendo o meio sólido YPG 2% adicionado de 0,6% (v/v) de uma solução

aquosa de ácido tartárico 10% (p/v). As placas foram colocadas em estufa a 30 °C durante 72 horas. As colônias de leveduras isoladas crescidas foram observadas em microscópio ótico e então semeadas em placas de Petri contendo meio sólido YPG 2% adicionado de cloranfenicol a uma concentração de 30 µg/ml de meio. As placas foram deixadas em estufa a 30 °C durante 72 horas.

As colônias puras obtidas, ou seja, isentas de qualquer contaminação, com características morfológicas de *Saccharomyces cerevisiae*, foram identificadas utilizando números cardinais e transferidas para tubos de ensaio contendo meio sólido inclinado YPG 2% e colocadas em estufa a 30 °C durante 24 horas.

Para o isolamento, em cada meio de cultura utilizado os microrganismos foram semeados cinco vezes.

4.7 CONSERVAÇÃO DAS LEVEDURAS

Uma colônia representativa de cada levedura pura isolada e a levedura comercial CK – UVAFERM (*Saccharomyces cerevisiae*, variedade *cerevisiae*), utilizada nos experimentos como controle, foram semeadas em tubo de ensaio contendo meio sólido inclinado YPG 2% e após crescimento foram mantidas a 4 °C, fazendo-se transferências bimestrais.

4.8 PREPARO DO INÓCULO

As leveduras isoladas e a levedura comercial CK foram semeadas em tubo de ensaio contendo o meio sólido inclinado YPG 2%, colocadas em estufa a 30 °C, durante 12 horas. Após o período de crescimento, em balão volumétrico de 10 ml de capacidade, previamente esterilizado, foi preparado uma suspensão de células de cada levedura com água destilada estéril, e realizada a leitura da turbidez a fim de se avaliar a concentração celular. Em seguida, uma alíquota de 200 µl destas suspensões, com densidade ótica em torno de 0,100 de absorbância a 650 nm, foi

semeada em placas de Petri contendo o meio a ser empregado nos testes de exclusão por estresse, assimilação de fonte de carbono e fonte de nitrogênio, testes de tolerância à temperatura e testes de produção de sulfeto de hidrogênio.

Para os experimentos de capacidade fermentativa, capacidade de floculação e tolerância ao etanol o volume de suspensão de células de cada levedura inoculado nos 10 ml de meio líquido, contidos em tubos de ensaio, foi aquele que forneceu uma densidade ótica (DO) entre 0,01 e 0,02 de absorbância a 650 nm, nos mililitros de meio empregado.

Foi verificada a pureza das suspensões de células utilizando coloração de Gram e análise do material a fresco (BIER, 1980).

4.9 TESTE DE EXCLUSÃO POR ESTRESSE

A cada condição de estresse empregada, o volume de inóculo das leveduras isoladas e da levedura controle CK semeado nas placas de Petri contendo os meios de cultura foi preparado como descrito no item (4.8).

Para verificar o efeito de cada condição de estresse no crescimento dos microrganismos, as leveduras isoladas e a levedura CK foram semeadas no meio sólido YPG 2% e colocadas em estufa a 30 °C durante 72 horas como controle.

Primeiramente as leveduras foram crescidas em meio sólido YPG 2% a 37 °C durante 72 horas. As leveduras que cresceram nesta temperatura foram transferidas para o meio sólido YPG 2% contendo 8% (v/v) de etanol e colocadas em estufa a 30 °C durante 72 horas. As leveduras crescidas na presença de etanol foram semeadas em meio básico sólido contendo 20 g% (p/v) de glicose e colocadas em estufa a 30 °C durante 72 horas. As leveduras resistentes a esta concentração de fonte de carbono foram crescidas em meio básico sólido contendo 20 g% (p/v) de sacarose adicionado de 8% (v/v) de etanol a 30 °C durante 72 horas.

O experimento foi realizado duas vezes e em cada meio de cultura utilizado os microrganismos foram semeados no mínimo três vezes.

4.10 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LEVEDURAS

As leveduras selecionadas após o teste de exclusão por estresse foram submetidas a testes de crescimento em diferentes fontes de carbono e de assimilação de fontes de nitrogênio. As leveduras com características compatíveis com *Saccharomyces cerevisiae* segundo VAUGHAN-MARTINI e MARTINI (1993) e SANNI e LONNER (1993) foram selecionadas e as demais excluídas de estudos posteriores.

4.10.1 Testes de assimilação de fontes de carbono

As leveduras selecionadas e a levedura controle CK foram submetidas aos testes de assimilação de fontes de carbono, de maneira que uma alíquota de 200 µl do inóculo, preparado conforme descrito no item 4.9, foi semeado em placas de Petri contendo meio *Yeast Nitrogen Base* acrescentado da fonte de carbono a ser testada (glicose 2 g%, sacarose 2 g%, maltose 2 g%, galactose 2 g%, rafinose 2 g%, manitol 2 g%, lactose 2 g%, celobiose 2 g% e xilose 2 g%). As placas foram deixadas em estufa à 30 °C durante 72 horas e o crescimento das leveduras foi observado. Apenas as leveduras que apresentaram crescimento de acordo com a chave de identificação proposta por VAUGHAN-MARTINI e MARTINI (1993) para *Saccharomyces* foram submetidas a todos os testes de assimilação de fontes de carbono.

Em paralelo a cada fonte de carbono testada, as leveduras selecionadas e a levedura controle CK foram semeadas em meio sólido YPG 2% e colocadas em estufa a 30 °C durante 72 horas como controle do crescimento.

4.10.2 Testes de assimilação de fontes de nitrogênio

As leveduras selecionadas e a levedura controle CK foram semeadas, como descrito no item preparo do inóculo (4.8), em placas de Petri contendo o meio *Yeast Carbon Base* acrescentado de diferentes fontes de nitrogênio a serem testadas

(lisina 2 g%, nitrato de potássio 2 g% e nitrito de sódio 2 g%) e em placas contendo o meio sólido YPG 2% (controle). As placas foram colocadas em estufa a 30 °C durante 72 horas. Somente as leveduras que apresentaram crescimento em concordância com a chave de identificação para *Saccharomyces* foram submetidas a todos os testes de assimilação de fontes de nitrogênio (VAUGHAN-MARTINI e MARTINI, 1993).

4.10.3 Testes de capacidade fermentativa

Para verificar a capacidade fermentativa de cada levedura e da levedura controle CK, um volume de inóculo, preparado conforme descrito no item 4.8, foi inoculado em tubos de ensaio de vidro com tampa de rosca, previamente identificados, contendo em seu interior tubos de Durhan e 10 ml de meio líquido YP acrescentado da fonte de carbono a ser testada. Os tubos foram colocados em estufa a 30 °C durante 24 horas e foram observados o crescimento das leveduras, pela turvação dos meios, e a formação de gás (VAUGHAN-MARTINI e MARTINI 1993). As fontes de carbono testadas foram: glicose 2 g%, sacarose 2 g%, maltose 2 g%, galactose 2 g%, rafinose 2 g% e lactose 2 g%.

4.11 OUTROS CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DE LEVEDURAS

4.11.1 Teste de tolerância ao etanol

Para verificar o efeito da concentração de etanol no crescimento, um volume de inóculo (item 4.8) das leveduras selecionadas e da levedura controle CK foi inoculado em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio líquido YPG 2% sem e com suplementação de etanol nas concentrações variáveis de 10% (v/v), 13% (v/v) e 15% (v/v). Os tubos foram colocados em estufa a 30 °C durante 72 horas.

4.11.2. Teste de tolerância à temperatura

Conforme o item “preparo do inóculo”, as leveduras selecionadas e a levedura controle CK foram semeadas em placas de Petri contendo meio sólido YPG 2% e colocadas em estufas com diferentes temperaturas durante 72 horas. Para verificar o efeito da temperatura no crescimento foram empregados 25 °C, 30 °C, 37 °C e 45 °C.

4.11.3 Teste de floculação

As leveduras selecionadas e a levedura controle CK foram semeadas, como descrito no item preparo do inóculo (4.8), em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio líquido YPG 2%. Os tubos foram deixados em estufa a 30 °C durante 72 horas e após este período de tempo foram levados à agitação em aparelho vórtex para visualização da formação de flocos.

4.11.4 Teste de produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S)

As leveduras selecionadas e a levedura controle CK foram semeadas (item 4.8) em placas de Petri contendo meio Agar LA e em placas de Petri contendo o meio sólido YPG 2% (controle) e para o crescimento foram colocadas em estufa a 30 °C durante 10 dias, conforme descrito por ONO, et. al. (1991). Decorrido o tempo, foi observado o aparecimento ou não de colônias enegrecidas, característica de produção do sulfeto de hidrogênio. Foram realizados cinco repiques para cada levedura isolada.

4.12 CARACTERIZAÇÃO DAS LEVEDURAS SELECIONADAS POR ENSAIOS MOLECULARES

4.12.1 Cultivo das leveduras selecionadas

As leveduras selecionadas e a levedura comercial CK foram semeadas em tubo de ensaio contendo o meio sólido inclinado YPG 2% e colocadas em estufa a 30 °C durante 12 horas. Após o período de crescimento, em balão volumétrico de 25 ml de capacidade, previamente esterilizado, foi preparado uma suspensão de células de cada levedura com água destilada estéril. Com auxílio de uma pipeta estéril, foi transferido para os 50 ml de meio líquido YPG 2%, contidos em erlenmeyer de 250 ml de capacidade, um volume da suspensão de células de modo a obter uma densidade óptica (DO) de 0,200 de absorbância a 650 nm em cada meio de cultivo. Em seguida, os erlenmeyers foram colocados em agitador orbital a 150 rpm, a 30 °C durante 12 horas para o crescimento.

4.12.2 Extração do DNA genômico das leveduras

A biomassa celular das leveduras selecionadas e da levedura controle CK, obtida conforme descrito no item 4.12.1, contida em 10 ml de meio, foi separada por centrifugação a 4.000 rpm durante 5 minutos, lavada com água ultrapura estéril gelada e foi repetido o processo de centrifugação anterior. As células foram ressuspensas em 200 µl de tampão de extração, transferidas para tubos estéreis de 1,5 ml de capacidade, adicionado de bolinhas de vidro estéreis e 200 µl de solução fenol-clorofórmio (1:1). Os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex durante 2 minutos e foram acrescentados 200 µl de tampão Tris – EDTA pH 8,0 seguido de cuidadosa homogeneização por inversão de 6 a 10 vezes e centrifugação a 13.000 rpm durante 5 minutos. A fase aquosa foi separada, recolhida em novo tubo estéril de 1,5 ml de capacidade, acrescentado 400 µl de clorofórmio, homogeneizado por inversão e repetido o processo de centrifugação anterior. Em um tubo novo estéril, foi recolhida a fase aquosa, acrescentado 1 ml de etanol absoluto, homogeneizado

por inversão e centrifugado a 13.000 rpm durante 2 minutos. O sobrenadante foi removido e o sedimento formado lavado com 1 ml de etanol 70% (v/v) e centrifugado a 13.000 rpm durante 2 minutos. O sobrenadante foi separado e o tubo com o sedimento colocado em estufa a 37 °C até secagem completa do material. Após secagem, o DNA foi ressuspenso em 400 µL de solução tampão Tris – EDTA pH 8,0 contendo uma concentração final de 2 µg/ ml RNaseA e incubado a 37 °C durante 30 minutos. Este processo foi repetido desde a etapa da adição do clorofórmio até a secagem completa do DNA. O DNA foi ressuspenso em 50 µl de solução tampão Tris – EDTA pH 8,0 e mantido a 4 °C.

4.12.3 Quantificação do DNA genômico

Uma alíquota de 15 µl da amostra de DNA genômico, preparada conforme descrito no item 4.12.2, foi adicionada em 3 ml de solução tampão Tris – EDTA pH 8,0. A solução foi transferida para uma cubeta de quartzo para realizar leitura da absorbância a 260 nm. O cálculo da concentração de DNA presente em cada amostra foi feito a partir de dados da literatura nos quais 1,0 de absorbância a 260 nm corresponde a uma solução contendo 50 µl/ ml de DNA (AUSUBEL, S. M. et al., 1999).

4.12.4 Amplificação do DNA genômico pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25 µl contendo 10 µl de solução Eppendorf® MasterMix (2,5x), 10 pmol de iniciadores e 70 ng de DNA genômico das leveduras .

Foram empregados iniciadores específicos para a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, descritos por SABATÉ, GUILLAMON e CANO (2000). Estes iniciadores permitem a amplificação de um fragmento de 1170 pb compreendidos entre o nucleotídeo 161 da região intergênica ITS-1 e o nucleotídeo 585 do gene que codifica o RNAr 25S.

A seqüência dos iniciadores utilizados está descrita na TABELA 3

TABELA 3 – SEQUÊNCIA DOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR

INICIADOR	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIA
SC1	5' – AACGGTGAGAGATTTCTGTGC – 3'	SABATÉ, J.; GUILLAMON, J.M.; CANO, J. 2000
SC2	5' – AGCTGGCAGTATTCACAG – 3'	

As amplificações foram feitas em termociclador programado da seguinte forma: um ciclo a 94 °C durante quatro minutos, seguido de 30 ciclos de um minuto a 94 °C, um minuto a 57 °C e dois minutos e meio a 72 °C, e um ciclo a 72 °C por cinco minutos.

Os produtos da reação foram detectados utilizando eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X a 2,4 V/cm durante duas horas. Foi utilizado o marcador de tamanho molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®). O gel foi corado com solução de brometo de etídio durante 20 minutos, descorado em água destilada por mais cinco minutos e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado.

4.12.5 RAPD – PCR (Reação em cadeia da polimerase – polimorfismo de DNA amplificado ao acaso)

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25 µl contendo 50 pmol de iniciador, 750 ng de DNA genômico das leveduras e 10 µl de solução Eppendorf® MasterMix (2,5x) contendo 1,5 µl de magnésio, à qual foi adicionada 1,5 µl de solução de magnésio 25 mM Eppendorf® a fim de obter uma concentração final de 3 mM de magnésio. Dois ensaios foram realizados, por amostra, para verificar a reprodutibilidade da reação.

A seqüência dos iniciadores utilizados está descrita na TABELA 4. A síntese dos iniciadores foi realizada pela Invitrogen®.

TABELA 4 – SEQUÊNCIA DOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE RAPD-PCR

INICIADOR	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIA
OPB – 01	5' – GTTTCGCTCC – 3'	ECHEVERRIGARAY, S.; TORESAN-PAESE, S.; CARRAU, J.L., 2000
OPB – 10	5' – CTGCTGGGAC – 3'	
OPB – 12	5' – CCTTGACGCA – 3'	
OPB – 14	5' – TCCGCTCTGG – 3'	
OPX – 01	5' – CTGGGCACGA – 3'	
OPX – 03	5' – TGGCGCAGTG – 3'	
OPX – 06	5' – ACGCCAGAGG – 3'	
OPX – 07	5' – GAGCGAGGCT – 3'	
AB1 – 15	5' – GGAGGGTGTT – 3'	XUFRE, et. al., 2000
P – 20	5' – AGGAGAACGG – 3'	XUFRE, et. al., 2000

As amplificações foram feitas em termociclador programado da seguinte forma: um ciclo a 94 °C durante quatro minutos, seguido de 40 ciclos de um minuto a 94 °C, um minuto a 36 °C e dois minutos a 72 °C, e um ciclo de quatro minutos a 72 °C. Os produtos das reações foram separados em gel de agarose a 1,8% em tampão TBE 1X a 2,4 V/cm em duas horas e meia. Foram utilizados os marcadores de tamanho molecular 1 Kb Plus DNA Ladder e 100 bp DNA Ladder. O gel foi corado com solução de brometo de etídio durante 20 minutos, descorado em água destilada por mais cinco minutos e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado.

O padrão de bandas de amplificação obtido para cada levedura foi analisado com o *software* NTSYSpc (ROHLF, 1998).

4.13 EXPERIMENTOS DE MICROVINIFICAÇÕES

4.13.1 Preparo do mosto de suco de uva

Os experimentos de microvinificações foram realizados com a variedade de uva Terci (*Vitis labrusca*), a mesma utilizada para elaboração de vinhos tintos na região de Colombo.

A uva utilizada foi disponibilizada pela vinícola Pedro Strapasson, Município de Colombo, com apoio da Secretaria da Agricultura, Abastecimento e Meio Ambiente dessa localidade, no mês de janeiro de 2004, período em que o produtor determinou como sendo o mais adequado para a vindima, quando as uvas atingiram o ponto máximo de maturação (alta concentração de açúcar total e baixa acidez). No término da vindima as uvas foram transportadas em caixas de isopor até o laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações.

As uvas foram lavadas, desengaçadas e os grãos maduros e sadios foram escolhidos, pesados e rompidos manualmente, para a liberação do suco de uva. A partir de 9,3 kg de grãos de uvas foi obtido, após filtração com auxílio de gaze, um volume de 6.180 ml de suco de uva e foi determinado o teor de sólidos solúveis. Em seguida, foi realizada a correção da concentração de açúcares, conhecida como chaptalização, para obter uma concentração de 28 °Brix no suco de uva, que corresponde a 28% (p/v) de açúcar total, utilizando sacarose, para garantir a obtenção do grau alcoólico entre 10 e 13 °GL e o desenvolvimento da levedura. A dissolução da sacarose foi feita antes de sua adição ao suco de uva para evitar problemas de solubilização.

4.13.2 Microvinificação

Os experimentos de microvinificações foram realizados em frascos erlenmeyer de 500 ml de capacidade contendo um volume de 400 ml do mosto (suco de uva após adição de sacarose). Os frascos foram devidamente vedados com

tampão de algodão e esterilizados em autoclave sob vapor fluente durante 30 minutos.

Em balões volumétricos, foram preparadas suspensões de células, utilizando água destilada estéril, de cada levedura selecionada e da levedura controle CK, a partir de uma cultura pura de 12 horas crescida em tubo de ensaio contendo meio sólido inclinado YPG 2% a 30 °C. Em seguida, a fim de se avaliar a concentração celular das suspensões, foi realizada a contagem das células em câmara de Nöbauer no quadrado central que está dividido em 25 quadrados de 1/ 25 mm², sendo cada um desses subdividido em 16 quadrados de 1/ 400 mm², totalizando 400 quadrados e 0,1 mm³ na área central. Com auxílio de pipeta estéril foi transferido para cada erlenmeyer um volume de suspensão de modo a obter no início (tempo zero) de todos os experimentos 10⁵ células viáveis/ml de mosto.

Após inoculação no mosto das leveduras selecionadas e da levedura CK as microvinificações foram conduzidas em temperatura de 25 ± 1 °C sem agitação durante 20 dias, com retiradas de 2 ml de amostra de cada erlenmeyer cada 24 horas para determinação de açúcares, etanol, glicerol, ácido acético, ácido succínico e verificação do pH no início do processo.

As análises dos perfis de teores de açúcares (sacarose, glicose e frutose), glicerol, etanol e ácido acético foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em equipamento Shimadzu modelo LC-10AVP, módulo RID 10-A (Detector de Índice de Refração). A coluna utilizada foi Phenomenex Rezex ROA – Organic Acid OOH – 0138 – KO tamanho 300 x 7,80 mm. A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico 8 mM, fluxo de 0,5 ml/min e à temperatura ambiente. O volume de injeção foi de 20 µl, injetados manualmente.

Nos ensaios, foram empregados também um erlenmeyer de 500 ml de capacidade contendo 400 ml de suco de uva corrigido estéril sem inoculação de qualquer levedura, para verificação da eficácia da esterilização do mosto e um erlenmeyer de 500 ml de capacidade contendo 400 ml de suco de uva corrigido não esterilizado para permitir a fermentação espontânea do suco.

Os experimentos foram realizados três vezes e cada levedura foi inoculada em duplicata.

4.14 REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS

Os experimentos para verificar a capacidade fermentativa, de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, de tolerância ao etanol e à temperatura e os testes de floculação e produção de sulfeto de hidrogênio foram realizados em três ensaios independentes e para cada meio de cultura utilizado os microrganismos foram semeados em triplicata.

As microvinificações foram realizadas três vezes (experimentos independentes) e cada levedura foi inoculada em duplicata. Os resultados apresentados correspondem à média aritmética obtida em cada processo.

Os dados obtidos foram analisados por estatística descritiva, incluindo proporção, média e desvio padrão sendo o tratamento estatístico realizado em software Estatística da Microsoft®.

5.1 ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS

A espécie de levedura predominante nos processos fermentativos de produção de vinho é a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (IVORRA; PÉREZ-ORTIN; OLMO, 1999). Durante a fermentação alcoólica do suco de uva, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* produz etanol, dióxido de carbono e outros produtos secundários importantes para o aroma, sabor e qualidade do vinho (LILLY; LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000). Estes dados fornecem subsídios para o isolamento de leveduras, buscando-se apenas a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, a partir de diferentes amostras como: cachos de uvas, sucos de uvas, amostras coletadas em diferentes fases da fermentação e vinhos safra 2003, provenientes da região vinícola de Colombo – Paraná,

Os cachos de uvas colhidos em diferentes regiões demarcadas dos vinhedos, os sucos de uvas, os vinhos safra 2003 e as amostras coletadas pelos vinicultores, em tempos não pré-determinados durante a fase tumultuosa da fermentação vínica, foram semeados em meio YPG 2%. Após 72 horas a 30 °C, foi observado nas placas o crescimento de uma variedade de microrganismos, entre eles bactérias, leveduras e fungos filamentosos. As colônias crescidas apresentaram diferenças morfológicas na cor (branca e branco-amarelada), aspecto (superfície lisa e rugosa), forma (oval e elíptica) e brilho (brilhante e opaca).

A fim de eliminar os microrganismos indesejáveis, procedeu-se a semeadura das colônias obtidas em meio sólido YPG 2% contendo eritromicina 30 µg/ml de meio. Ao constatar, por técnica a fresco, que as colônias de leveduras crescidas neste meio ainda estavam contaminadas com algumas bactérias, elas foram semeadas em meio sólido YPG 2% adicionado de 0,6% de solução aquosa de ácido tartárico 10% (p/v) o que diminuiu gradativamente o número de bactérias presentes. Quando a este mesmo meio foi adicionado cloranfenicol (30 µg/ml de meio) foram obtidas culturas puras de leveduras.

Após a observação microscópica das leveduras crescidas verificou-se a presença de brotamentos, forma de reprodução característica do gênero *Saccharomyces*, e diferenças na morfologia (redondas, ovais e apiculadas) e dimensões celulares (PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1996).

A metodologia aplicada para o isolamento de leveduras permitiu a obtenção de 61 colônias de leveduras puras, as quais foram divididas em grupos, conforme representado na TABELA 5.

As leveduras isoladas foram empregadas nos experimentos subseqüentes visando selecionar leveduras *Saccharomyces*.

TABELA 5 – GRUPOS DE LEVEDURAS ISOLADAS A PARTIR DE UVAS VARIEDADE TERCÍ, SUCOS DAS UVAS, AMOSTRAS DA FASE TUMULTUOSA DA FERMENTAÇÃO VÍNICA E VINHOS SAFRA 2003, EMPREGANDO DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

PROCEDÊNCIA DA LEVEDURA ISOLADA	MEIO DE CULTURA	QUANTIDADE LEVEDURAS ISOLADAS
CASCAS DE UVA	YPG 2%	14
	YPG 2% + 30 µg /ml eritromicina	
	YPG 2% + 0,6% solução aquosa de ácido tartárico 10%	
	YPG 2% + 30 µg /ml cloranfenicol	
SUCOS DE UVAS E AMOSTRAS DA FASE TUMULTUOSA	YPG 2%	28
	YPG 2% + 30 µg /ml eritromicina	
	YPG 2% + 0,6% solução aquosa de ácido tartárico 10%	
	YPG 2% + 30 µg /ml cloranfenicol	
VINHOS TINTO SAFRA 2003	YPG 2%	19
	YPG 2% + 30 µg /ml eritromicina	
	YPG 2% + 0,6% solução aquosa de ácido tartárico 10%	
	YPG 2% + 30 µg /ml cloranfenicol	
TOTAL DE LEVEDURAS ISOLADAS		61

NOTA: Condições de crescimento:

Temperatura: 30 °C

Tempo: 72 horas

5.2 EXCLUSÃO POR ESTRESSE

Durante a fermentação alcoólica, as células de leveduras não encontram um ambiente fisiológico de condições ótimas, sendo expostas simultaneamente e seqüencialmente a várias condições de estresse, sendo o estresse osmótico e o etanólico considerados os mais importantes (QUEROL, et. al., 2003).

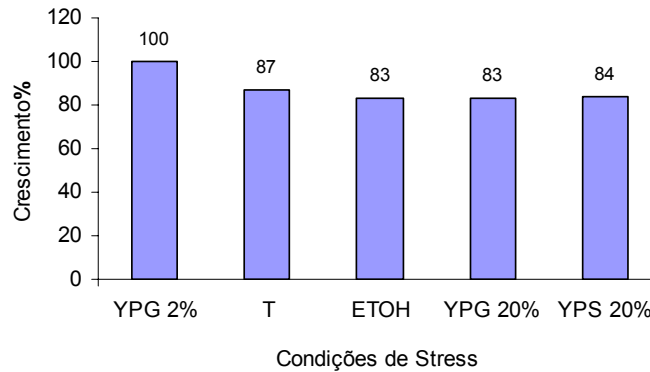
Segundo PATARO et. al. (2000), a maioria das espécies de leveduras isoladas de processos fermentativos artesanais, incluindo *Saccharomyces cerevisiae*, são fisiologicamente adaptadas às condições observadas nas dornas de fermentação. Elas são aptas a crescerem a 37°C, em meio contendo 50% de glicose e 8% etanol.

MORAIS et. al. (1997), relataram que leveduras com diferentes características de adaptação são observadas nos estágios iniciais da fermentação e leveduras já selecionadas pelas condições encontradas nas dornas nos estágios finais.

Neste experimento descrito no item 4.9, p. 39, foram simuladas as condições encontradas em dornas de fermentação vínica para verificar a possibilidade de crescimento das leveduras isoladas e da levedura controle CK a uma temperatura de 37 °C (estresse por temperatura), em presença de 8% de etanol (estresse etanólico), 20 g% de glicose (estresse osmótico) e 20 g% de sacarose.

Os resultados apresentados na FIGURA 1 demonstram a porcentagem de leveduras isoladas submetidas a diferentes situações e a sua habilidade em resistir à condição de estresse.

FIGURA 1 – PORCENTAGEM DE LEVEDURAS ISOLADAS CRESCIDAS EM CONDIÇÃO DE ESTRESSE TÉRMICO, ETANÓLICO, OSMÓTICO E NA PRESENÇA DE SACAROSE



NOTA:

YPG 2%: meio sólido YP + glicose 2 g%, temperatura 30 °C, 72 horas (controle)

T: meio sólido YP + glicose 2 g%, temperatura de 37 °C, 72 horas

ETOH: meio sólido YP + glicose 2 g% adicionado de 8% etanol, temperatura 30 °C, 72 horas

YPG 20%: meio sólido YP + glicose 20 g% adicionado de 8% etanol, temperatura 30 °C, 72 horas

YPS 20%: meio sólido YP + sacarose 20 g% adicionado de 8% etanol, temperatura 30 °C, 72 horas

Como pode ser observado na FIGURA 1, 87% (n= 61) do número total de leveduras semeadas em meio YPG 2% cresceram à uma temperatura de 37 °C. Quando as leveduras crescidas a 37 °C foram semeadas no mesmo meio suplementado com 8% (v/v) de etanol, à uma temperatura de 30 °C, 83% (n= 53) das leveduras foram resistentes. Todas as leveduras resistentes ao etanol também foram capazes de crescer em meio contendo 20 g% de glicose (83%, n=53). A levedura controle CK cresceu em todas as condições de estresse empregadas.

Ao realizarem análises de resistência a estresse, sob condições laboratoriais, como critério para seleção de leveduras vínicas, ZUZUARREGUI et. al. (2004 (b)) obtiveram dados indicativos de que normalmente leveduras com problemas durante o processo fermentativo mostram alta sensibilidade às condições adversas aplicadas. Além disso, devido à relação entre a resistência ao estresse e expressão de genes, é possível que diferenças na expressão de vários genes envolvidos na resistência ao estresse possam justificar a habilidade das células de leveduras em

resistir a estas condições adversas durante a produção de vinho.

A glicose é a fonte de carbono preferida por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e, em leveduras, a glicose e outros açúcares rapidamente fermentescíveis, como frutose e manose, reprimem a expressão de genes que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo de outras fontes de carbono como a sacarose. Este fenômeno é conhecido como repressão por glicose ou repressão catabólica. O gene SUC2 que codifica a enzima invertase tem sua expressão negativamente controlada pela presença de altas concentrações de glicose (mecanismo conhecido como Via Principal de Repressão por Glicose). Assim, quando a levedura é crescida em meio rico em glicose, o gene SUC2 estará reprimido e a produção de invertase é baixa. Por outro lado, se a levedura é crescida em meio contendo sacarose a transcrição do gene SUC2 é desreprimida e observa-se alta produção de invertase (GANCEDO, 1998).

Segundo PATARO, et. al., (1998), o crescimento de leveduras em meio contendo altas concentrações de sacarose favorece a seleção de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* que possuem uma atividade invertásica bastante desenvolvida. Esta propriedade é importante, uma vez que se presume que leveduras com atividade invertásica possuem uma maior capacidade fermentativa.

No ensaio onde foi empregado o meio sólido YP contendo 20 g% de sacarose a 30 °C após 72 horas de crescimento foram excluídas 16% (n= 44) das leveduras isoladas.

Os resultados, em termos de crescimento, mostram que 39,3% das leveduras isoladas foram excluídas, ou seja, das 61 leveduras isoladas, 37 (60,7%) leveduras permaneceram nos experimentos posteriores e que a determinação da resistência ao estresse permite uma seleção inicial de leveduras capazes de conduzir uma fermentação vínica.

5.3 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LEVEDURAS

As leveduras são tradicionalmente caracterizadas, classificadas e identificadas utilizando características morfológicas e fisiológicas. Para a identificação específica, estudos bioquímicos e de exigências nutricionais são mais

relevantes que traços morfológicos e sexuais, os quais são importantes na determinação genérica (PHAFF, 1990).

Estudos demonstram que as culturas puras de leveduras de vinho são taxonomicamente classificadas como pertencentes à espécie *Saccharomyces cerevisiae*, mas elas diferem significativamente nas propriedades de fabricação do vinho (THORTON; BUNKER, 1984).

Para a classificação taxonômica das leveduras isoladas dentro da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, foram empregados meios de cultura contendo diferentes fontes de carbono e fontes de nitrogênio conforme descrito nos itens 4.10.1, p. 40 e 4.10.2, p. 41. A escolha das fontes de carbono a serem empregadas foi baseada nos substratos que permitissem a exclusão de um maior número de leveduras de outra espécie que não *Saccharomyces cerevisiae*. Como critério de exclusão as leveduras foram submetidas à pelo menos quatro fontes de carbono assimiladas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (glicose, sacarose, maltose e galactose) e uma fonte de carbono não assimilada (manitol ou lactose), antes da sua exclusão. Somente as leveduras que apresentaram crescimento de acordo com a chave de identificação proposta por VAUGHAN-MARTINI e MARTINI (1993) para o gênero *Saccharomyces* foram submetidas a todos os testes de assimilação de fonte de carbono. Esta chave de identificação apresenta todos os testes fisiológicos necessários para uma identificação e separação taxonômica segura dentro do gênero *Saccharomyces*.

O crescimento esperado para leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em relação à assimilação de fonte de carbono, conforme estabelecido por VAUGHAN-MARTINI e MARTINI (1993) e SANI e LONNER (1993) está demonstrado na TABELA 6 assim como o resultado do crescimento das leveduras isoladas e da levedura CK em cada uma das fontes de carbono testadas. Os dados da TABELA 6 mostram um total de 15 (40,5%, n=37) leveduras isoladas incompatíveis com a espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Foram eliminadas quatro leveduras em galactose, quatro em sacarose, maltose e galactose, três em maltose, uma em sacarose, por não assimilarem a fonte de carbono empregada e três leveduras por assimilar o manitol.

TABELA 6 – CRESCIMENTO DAS LEVEDURAS ISOLADAS E LEVEDURA CK EM MEIO DE CULTURA CONTENDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO NA CONCENTRAÇÃO DE 2 g%

FONTE DE CARBONO TESTADA	• S. <i>cerevisiae</i>	CK	LEVEDURA ISOLADA																																											
			02	03	05	06	08	11	13	14	20	21	22	23	24	25	27	28	29	31	33	34	35	37	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61							
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Sacarose	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	/	/	+	/	+	/	+	+	+	/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	+	/	/	+	+	/	+
Manitol	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	/	/	-	/	-	/	-	-	-	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	/	/	-	-	/	-
Lactose	-	-	/	/	-	-	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Celobiose	-	-	/	/	-	-	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	-	-	-	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	/	/	-	-	/	-	
Xilose	-	-	/	/	-	-	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	-	-	-	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	/	/	-	-	/	-	

NOTA:

+ (assimila a fonte de carbono testada)

- (não assimila a fonte de carbono testada)

/ (levedura não submetida a fonte de carbono testada)

CK – levedura controle – UVAFERM – *Saccharomyces cerevisiae* variedade *cerevisiae*

S. *cerevisiae*: crescimento esperado para *Saccharomyces cerevisiae*

Para avaliar o crescimento das leveduras isoladas e da levedura CK em relação à assimilação de nitrogênio foram ensaiados como fontes de nitrogênio o nitrato de potássio, nitrito de sódio e lisina.

Todas as leveduras avaliadas (n=22) nos testes de assimilação de fonte de nitrogênio cresceram de acordo com a chave taxonômica de VAUGHAN-MARTINI e MARTINI (1993) e SANNI e LONNER (1993) para a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, como descrito na TABELA 7.

TABELA 7 – ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE NITROGÊNIO PELAS LEVEDURAS ISOLADAS E LEVEDURA CK

FONTES DE NITROGÊNIO TESTADA	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	CK	NÚMERO DE LEVEDURAS EXCLUÍDAS
Nitrato de Potássio	NA	NA	-
Nitrito de Sódio	NA	NA	-
Lisina	NA	NA	-
Total de leveduras isoladas com crescimento esperado para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>			22

NOTA:

NA = não assimila a fonte de nitrogênio testada

CK: levedura controle – UVAFERM – *Saccharomyces cerevisiae* variedade *cerevisiae*

Analisando as TABELAS 6 e 7, 22 leveduras resultaram em crescimento esperado para *Saccharomyces cerevisiae* nos experimentos de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio.

A capacidade fermentativa das leveduras isoladas e da levedura CK foi testada em meio líquido contendo diferentes fontes de carbono, como descrito no item 4.10.3, p. 41. Foi considerado resultado positivo os tubos de ensaio onde a produção de gás pôde ser evidenciada, indicativa de fermentação do substrato.

Diferenças na assimilação e na fermentação de compostos de carbono são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras, pois estes microrganismos apresentam uma variação diversificada na habilidade de fermentação de açúcares.

O carbono pode ser fornecido às leveduras na forma de açúcar, aldeídos, sais de alguns ácidos orgânicos, glicerina ou etanol, e ocasionalmente de alguma outra forma, dependendo do tipo da levedura. Ao considerar os açúcares como fonte de carbono, é importante lembrar a diferença que existe entre a capacidade de uma levedura em assimilar um açúcar e sua capacidade de fermentar o mesmo açúcar (PRESCOTT, 1962).

Os resultados apresentados na TABELA 8 demonstram a exclusão de sete (31,8%, n=22) leveduras isoladas. Das 22 leveduras isoladas submetidas ao teste, 4 não fermentaram a maltose, 2 leveduras não foram capazes de fermentar a galactose e 1 levedura não fermentou a rafinose.

Segundo estudos de VAUGHAN-MARTINI e MARTINI (1993) as características fisiológicas tradicionalmente consideradas importantes para separação de leveduras altamente fermentativas de *Saccharomyces*, não podem ser úteis para distinção entre espécies. Os testes de capacidade fermentativa separam apenas as leveduras do gênero *Saccharomyces* dos gêneros não-*Saccharomyces*, não diferenciando espécies.

As 15 leveduras, 24,6% da amostragem inicial (61), com características compatíveis com o gênero *Saccharomyces* segundo VAUGHAN-MARTINI e MARTINI (1993) e SANNI e LONNER (1993) foram selecionadas e as demais excluídas dos estudos posteriores.

TABELA 8 – CAPACIDADE FERMENTATIVA DAS LEVEDURAS ISOLADAS E DA LEVEDURA CK, UTILIZANDO MEIO YP ADICIONADO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO

FONTE DE CARBONO TESTADA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CK	LEVEDURA ISOLADA																							
			05	06	22	24	27	28	29	33	34	35	37	47	48	49	50	51	52	53	55	58	59	61		
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Maltose	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+			
Galactose	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+			
Rafinose	+	+	/	/	/	+	+	/	+	+	+	/	+	+	+	+	+	+	+	/	+	+	-			
Lactose	-	-	-	-	/	-	-	/	-	-	-	/	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	/			

NOTA:

+ (fermenta a fonte de carbono testada)

- (não fermenta a fonte de carbono testada)

/ (levedura não submetida a fonte de carbono testada)

CK: levedura controle – UVAFERM – *Saccharomyces cerevisiae* variedade *cerevisiae*

5.4 OUTROS CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DAS LEVEDURAS

Algumas características enológicas como a tolerância ao etanol, à temperaturas elevadas, capacidade de floculação e a não produção de sulfeto de hidrogênio, são qualidades importantes que as leveduras devem apresentar (IRANZO; BRIONEZ-PÉREZ; IZQUIERDO-CANÃS, 1998).

Segundo CHI e AMEBORG (2000) o estresse etanólico é provavelmente uma das condições mais interessantes para ser analisada, uma vez que a tolerância ao etanol é um critério tradicional utilizado na seleção de leveduras, devido a presença de uma concentração elevada desta substância durante a vinificação.

MORAIS et. al. (1997) observaram que no início da fermentação a atividade microbiana promove aumento na graduação alcoólica e acidificação do mosto. A tolerância ao etanol, a concentração de açúcares e a adaptação à elevada acidez, são fatores responsáveis pela persistência de algumas espécies e desaparecimento de outras durante o processo. Vários parâmetros fisiológicos permitem que o gênero *Saccharomyces* domine a fermentação de suco de uvas, mas a tolerância a alta concentração de etanol é a principal característica que permite sua sobrevivência neste ambiente específico (PINA, et. al., 2004).

Estudos de CHI e AMEBORG (2000) demonstraram que leveduras *Saccharomyces cerevisiae* adaptam-se diferentemente à produção de etanol e que estas adaptações estão relacionadas às mudanças na frequência de indução de mutantes e no conteúdo lipídico da célula.

O acúmulo de etanol no ambiente representa uma forma de estresse químico sobre os microrganismos e vários estudos relatam que a membrana plasmática é o primeiro alvo da sua ação nestas situações. Além disso, a tolerância ao etanol em leveduras tem sido relacionada à capacidade das células em modificar sua composição lipídica para responder ao efeito provocado por esta substância (PINA, et. al., 2004).

TORIJA et. al. (2003) estudaram o efeito da temperatura em relação aos parâmetros analíticos de produção de etanol, ácido acético e glicerol e em relação a viabilidade das leveduras, demonstrando que a temperatura afeta não somente a

cinética da fermentação, mas também o metabolismo das leveduras, o qual determina a composição química do vinho e conseqüentemente sua qualidade. Eles observaram a temperaturas entre 25 °C e 30 °C uma curva de crescimento usual e a 35 °C uma grande quantidade de leveduras mortas. Concluíram que a alta mortalidade celular pode induzir uma finalização demorada do processo e produzir fermentações “paradas” (*stuck fermentations*) com grandes quantidades de açúcares residuais. À medida que a temperatura aumenta a viabilidade celular diminui devido, provavelmente, ao acúmulo de etanol intracelular o qual altera a estrutura da membrana e diminui sua funcionalidade.

Com o objetivo de determinar o efeito da concentração do etanol e da temperatura no crescimento das leveduras selecionadas e da levedura CK, foram realizados experimentos utilizando quantidades de etanol de modo a obter concentrações de 10% (v/v), 13% (v/v) e 15% (v/v) no meio de cultura e empregadas temperaturas de 25 °C, 30 °C, 37 °C e 45 °C (itens 4.11.1 e 4.11.2, p. 42). Os resultados obtidos após 72 horas de crescimento estão mostrados na TABELA 8.

Todas as leveduras (n=15) testadas foram tolerantes à concentração de 10% (v/v), oito leveduras (53,3%) tolerantes à 13% (v/v) e apenas três leveduras (20%) cresceram na concentração de 15% (v/v) de etanol. Em relação a esta característica enológica, a TABELA 9 evidencia as leveduras selecionadas 24, 27, 29, 34, 49, 52, 53 e 59 como mais resistentes ao etanol.

A variação no crescimento em função da temperatura em meio sólido YPG 2%, como pode ser observado na TABELA 9, a temperaturas elevadas somente a levedura isolada 52 cresceu a 45 °C. Quando foram empregadas temperaturas entre 25 °C a 37 °C todas as leveduras foram capazes de crescer.

TABELA 9 – VARIACÃO NO CRESCIMENTO DAS LEVEDURAS SELECIONADAS E DA LEVEDURA CK EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ETANOL E DA TEMPERATURA UTILIZANDO MEIO YPG 2%

LEVEDURA ISOLADA	CONCENTRAÇÃO ETANOL			TEMPERATURA		
	10%	13%	15%	25 °C	37 °C	45 °C
24	+++	++	+	+++	+++	-
27	+++	+++	+++	+++	+++	-
29	+++	++	+	+++	+++	-
33	+++	-	-	+++	+++	-
34	+++	+	-	+++	+++	-
37	+++	-	-	+++	+++	-
47	+++	-	-	+++	+++	-
48	+++	-	-	+++	+++	-
49	+++	+	-	+++	+++	-
50	+++	-	-	+++	+++	-
51	+++	-	-	+++	+++	-
52	+++	++	-	+++	+++	+
53	+++	++	-	+++	+++	-
58	+++	-	-	+++	+++	-
59	+++	+	-	+++	++	-
CK	+++	++	-	+++	+++	+

NOTA:

+++ crescimento intenso na condição testada

++ crescimento moderado na condição testada

+ pouco crescimento na condição testada

- sem crescimento na condição testada

CK levedura controle – UVAFERM – *Saccharomyces cerevisiae* variedade *cerevisiae*

A tolerância de leveduras vínicas à temperatura elevada vem sendo largamente estudada. Embora essa condição não seja usualmente encontrada durante a fermentação, especialmente com os sistemas de controle de temperatura utilizados nos dias de hoje, altas temperaturas podem ocorrer durante o processo de produção de biomassa e secagem das leveduras, estágios requeridos para a preparação industrial de leveduras vínicas (FOLCH-MALLOL; GARAY-ARROYO; LLEDIAS, 2004).

Em seguida as 15 leveduras selecionadas foram submetidas aos testes de capacidade de floculação espontânea e produção de sulfeto de hidrogênio.

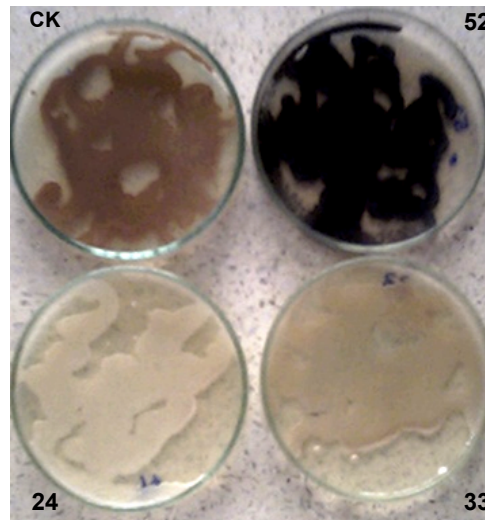
O interesse em leveduras floculantes se dá por dois motivos: o primeiro diz respeito à separação econômica do produto fermentado no final da fermentação enquanto o outro deriva do interesse comercial da utilização de leveduras imobilizadas em fermentações (STRATFORD, 1992).

Para verificar a capacidade de floculação espontânea as leveduras selecionadas e a levedura CK foram inoculadas em meio líquido YPG 2% a 30 °C (item 4.11.3, p. 42). Transcorrido o período de incubação, a cultura depositada no fundo do tubo foi homogeneizada e a avaliação consistiu na visualização dos flocos suspensos no meio de cultura, como foi proposto por SUZZI et al. (1984). Foi observado a capacidade de floculação espontânea das 15 leveduras, das quais 1 (6,67%) floculou e 14 (93,3%) não flocularam, como mostra a TABELA 10. A floculação deixa o mosto livre de células mais rapidamente, diminuindo o tempo de espera para decantação, e assim, eliminando a necessidade de utilização de processos de filtração e/ou centrifugação.

O processo de floculação é controlado por um complexo de inter-relações de fatores genéticos, fisiológicos e ambientais. Assim, as modificações que geram a floculação das células de leveduras são oriundas das mudanças na estrutura química de suas paredes celulares resultantes dos processos metabólicos do organismo. Deste modo, mesmo em circunstâncias onde o genótipo das células e as condições fisiológicas permitem a floculação, sua realização depende de condições ambientais favoráveis (BRITES, 2003).

Diante desses dados, todas as leveduras, floculantes ou não, foram submetidas ao teste de produção de sulfeto de hidrogênio. Neste teste as leveduras selecionadas e a levedura CK foram crescidas em placas de Petri como descrito no item 4.11.4, p. 42. Durante o acompanhamento do crescimento das leveduras selecionadas e da levedura CK em meio Ágar LA a produção de sulfeto de hidrogênio foi observada pela variação de cor no perfil de pigmentação, como mostra a FIGURA 2. A levedura selecionada 52 apresentou colônias enegrecidas, característica de leveduras superprodutoras de sulfeto de hidrogênio. No entanto, a levedura selecionada 33 e a levedura CK produziram pouco sulfeto de hidrogênio.

FIGURA 2 – VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO APÓS CRESCIMENTO EM MEIO ÁGAR LA DAS LEVEDURAS SELECIONADAS 24, 33, 52 E LEVEDURA CK



GIUDICI e KUNKEE (1994) afirmaram que linhagens com baixa atividade de sulfito redutase não têm capacidade de produzir quantidades detectáveis de sulfeto de hidrogênio.

A coloração das colônias das leveduras selecionadas e levedura CK em meio Ágar LA também foi comparada visualmente com a coloração em meio YPG 2% e os resultados estão demonstrados na TABELA 10.

As leveduras superprodutoras de sulfeto de hidrogênio são indesejáveis para o processo fermentativo, pois agregam odor e sabor desagradáveis às bebidas (RIBEIRO e HORII, 1999), por esta razão somente a levedura selecionada 52 foi excluída dos experimentos de microvinificações.

Apesar da pequena ou média produção de sulfeto de hidrogênio apresentada durante as cinco sementeiras realizadas em meio Ágar LA pelas demais leveduras selecionadas, elas não foram eliminadas dos experimentos de microvinificações, em virtude de que existem diferenças físicas e nutricionais entre crescimento em meio indicador e condições fermentativas (JIRANEK, V. LANGRIDGE; HENSCHKE, 1995).

TABELA 10 – CAPACIDADE DE FLOCULAÇÃO E PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO DAS LEVEDURAS SELECIONADAS E DA LEVEDURA CK

LEVEDURA ISOLADA	CAPACIDADE FLOCULAÇÃO ESPONTÂNEA	PRODUÇÃO SULFETO DE HIDROGÊNIO
24	-	-
27	+	+
29	-	++
33	-	+
34	-	++
37	-	-
47	-	-
48	-	-
49	-	++
50	-	+
51	-	++
52	-	+++
53	-	-
58	-	-
59	-	-
CK	-	++

NOTA:

+++ produz quantidade elevada de sulfeto de hidrogênio

++ produz quantidade média de sulfeto de hidrogênio

+ produz pequena quantidade de sulfeto de hidrogênio / pouca floculação

- não produz sulfeto de hidrogênio / não floculante

CK levedura controle – UVAFERM – *Saccharomyces cerevisiae* variedade *cerevisiae*

As leveduras selecionadas 24, 27, 29, 33, 34, 37, 47, 48, 49, 50, 51, 53, 58 e 59 (n=14) apresentaram identificação compatível com o gênero *Saccharomyces* segundo VAUGHAN-MARTINI e MARTINI (1993) e SANNI e LONNER (1993) e propriedades enológicas, como tolerância etanol à concentração de 10% (v/v) e à temperatura de 37 °C e a não produção em excesso de sulfeto de hidrogênio, que atendem a critérios e características apropriados ao processo de produção de vinho. Essas leveduras selecionadas foram submetidas à caracterização por ensaios moleculares e experimentos de microvinificação.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DAS LEVEDURAS SELECIONADAS POR ENSAIOS MOLECULARES

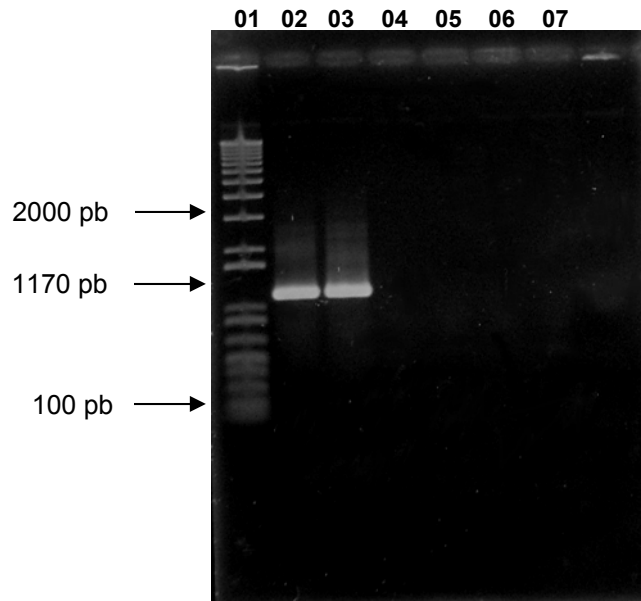
As leveduras selecionadas e a levedura CK foram analisadas utilizando PCR com iniciadores específicos para *Saccharomyces cerevisiae*, desenhados por SABATÉ; GUILLAMON; CANO (2000), designados SC1 e SC2.

Segundo SABATÉ; GUILLAMON; CANO (2000), a reação de PCR realizada com os iniciadores SC1 e SC2 produzem produtos de amplificação de 1170 pares de base (pb) somente com leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Amplificações inespecíficas podem ocasionalmente aparecer em *Saccharomyces bayanus* e *Saccharomyces pastorianus*. Quando estas amplificações não específicas ocorrem elas mostram um padrão de cinco bandas entre 360 a 1290 pb que não são confundidas com os produtos obtidos para *Saccharomyces cerevisiae*.

Foram realizadas reações de PCR com DNA genômico de *Saccharomyces cerevisiae* variedade *cerevisiae* (CK), *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus* (BC), *Schyzosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces marxianus*, *Phaffia rhodozyma* e da levedura isolada 31, excluída da espécie *Saccharomyces cerevisiae* pelos resultados obtidos no teste de utilização de fonte de carbono, por não assimilar sacarose, maltose e galactose. Os resultados obtidos são mostrados na FIGURA 3, onde podem ser observados a amplificação com os iniciadores SC1 e SC2 somente para *Saccharomyces cerevisiae* variedade *cerevisiae* (CK) e *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus* (BC). Para *Schyzosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces marxianus*, *Phaffia rhodozyma* e levedura isolada 31 não ocorreu amplificação, como esperado, uma vez que os iniciadores são específicos para *Saccharomyces cerevisiae*. Esses resultados mostram a especificidade dos iniciadores.

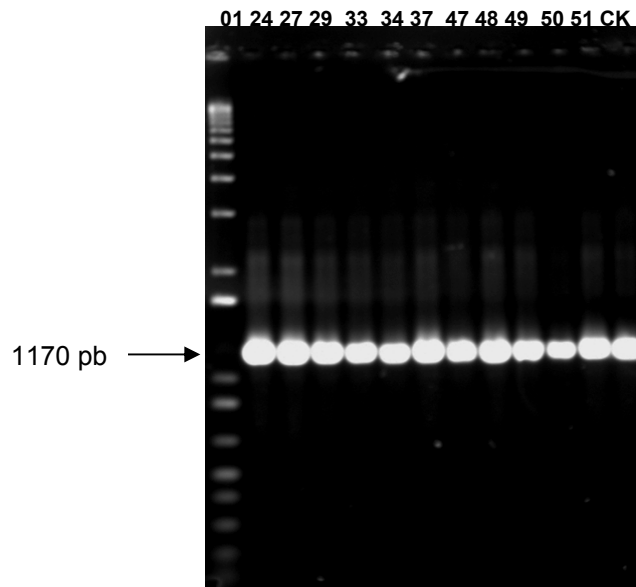
Desta forma, foram realizadas reações de PCR com todas as leveduras selecionadas. O resultado pode ser observado na FIGURA 4, onde são visualizadas bandas de 1170 pb para todas as leveduras, indicando que as mesmas pertencem à espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

FIGURA 3 – AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS INICIADORES SC1 E SC2.



Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando resultados de PCR utilizando como molde DNA genômico de vários organismos. Linha 01: marcador de tamanho molecular 1 kb *plus DNA ladder*, (Invitrogen). Linhas 02 leveduras *Saccharomyces cerevisiae* variedade *cerevisiae* (CK), 3 *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus* (BC), 4 levedura isolada 31, 5 *Kluyveromyces marxianus*, 6 *Schyzosaccharomyces pombe*, 7 *Phaffia rhodozyma*.

FIGURA 4 – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE REALIZADA COM INICIADORES SC1 E SC2



Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando resultados das reações de PCR realizadas utilizando como molde DNA genômico das leveduras selecionadas. Linha 01: marcador de tamanho molecular 1 kb *plus DNA ladder*. Linhas 02 – 14 leveduras selecionadas: 24, 27, 29, 33, 34, 37, 47, 48, 49, 50, 51, *Saccharomyces cerevisiae* variedade *cerevisiae* (CK).

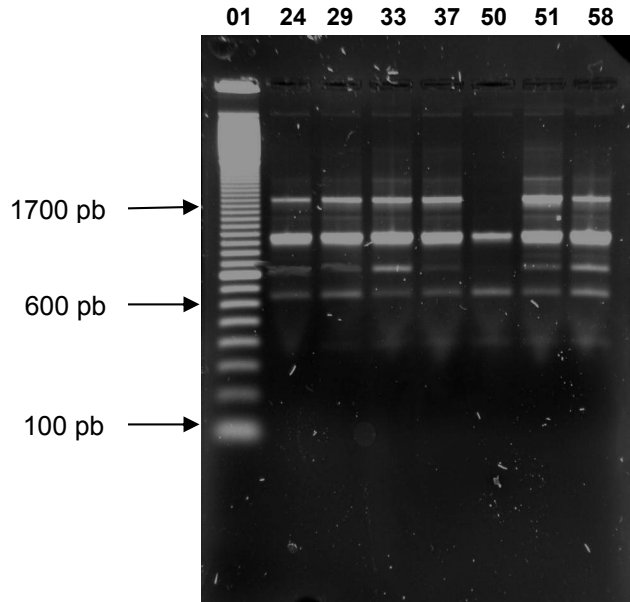
As reações de RAPD-PCR vêm sendo utilizadas como técnica de identificação de leveduras vínicas (RATÓN, 2004). No presente trabalho o ensaio de RAPD-PCR foi utilizado para estudar variações ao nível de DNA entre as leveduras selecionadas. A presença/ausência de bandas nos perfis de RAPD-PCR apresentados pelas leveduras foram analisadas com o software NTSYSpc (ROHLF, 1998).

Para as reações de RAPD foram utilizados 10 iniciadores descritos no item 4.12.5. Destes, nove geraram produtos de amplificação e o iniciador OPB-14 não produziu bandas de amplificação com nenhuma levedura selecionada.

A FIGURA 5 mostra os padrões de bandas encontrados para as reações com o iniciador OPB-12. Observa-se na figura que dois perfis diferentes foram encontrados, agrupando as leveduras 24, 27, 29, 33, 34, 37, 47, 48, 49, 51, 53, 58 e CK com um padrão de quatro bandas, sendo duas mais intensas com aproximadamente 1700 pb e 1200 pb, e duas outras com aproximadamente 650 pb e 850 pb. A levedura 50 apresenta padrão diferente com somente duas bandas (uma banda intensa em 1200 pb e uma banda de menor intensidade em 650 pb).

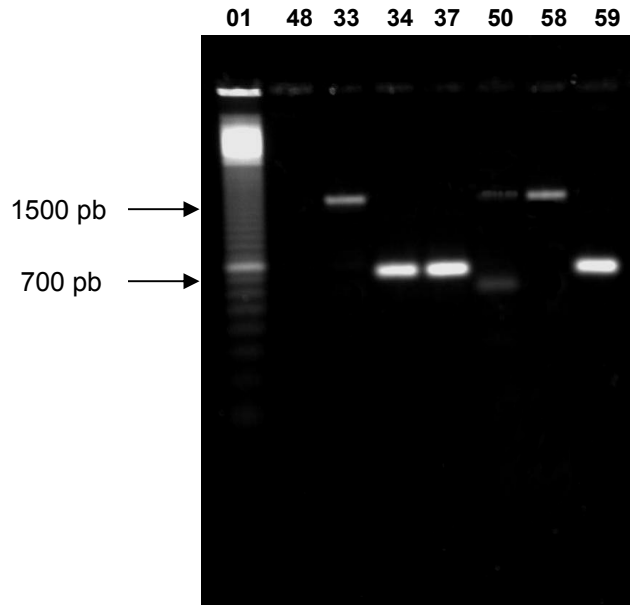
Os padrões de bandas encontrados para as reações com o iniciador OPB-01 estão demonstrados na FIGURA 6. Com este iniciador foi possível obter três perfis diferentes para as leveduras: um grupo com uma banda intensa de aproximadamente 1500 pb (leveduras 24, 27, 29, 33, 47, 48, 49, 51, 53, 58 e CK), um grupo com uma banda intensa de aproximadamente 750 pb (leveduras 34, 37 e 59) e a levedura selecionada 50 com um padrão de duas bandas, de fraca intensidade em 1500 pb e 650 pb.

FIGURA 5 – PERFIL DE RAPD-PCR UTILIZANDO INICIADOR OPB-12.



Fotografia de gel de agarose 1,8% com produtos de RAPD-PCR realizado com DNA genômico das leveduras selecionadas. Linha 01: marcador de tamanho molecular 100 pb DNA *ladder*, (Invitrogen). Linhas 02 – 08: leveduras selecionadas 24, 29, 33, 37, 50, 51, 58.

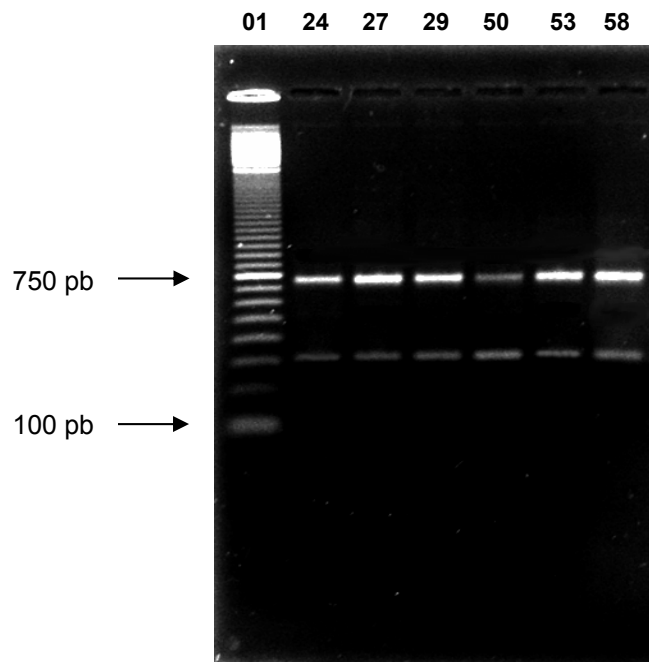
FIGURA 6 – PERFIL DE RAPD-PCR UTILIZANDO INICIADOR OPB-01.



Fotografia de gel de agarose 1,8% com produtos de RAPD-PCR realizado com DNA genômico das leveduras selecionadas. Linha 01: marcador de tamanho molecular 100 pb DNA *ladder*, (Invitrogen). Linhas 02 – 08: leveduras selecionadas 48, 33, 34, 37, 50, 58 e 59.

A FIGURA 7 mostra o perfil de amplificação de DNA por RAPD-PCR utilizando o iniciador OPB-10. Este iniciador não permitiu a diferenciação das leveduras selecionadas, uma vez que todas apresentaram uma banda em 750 pb e uma em 300 pb.

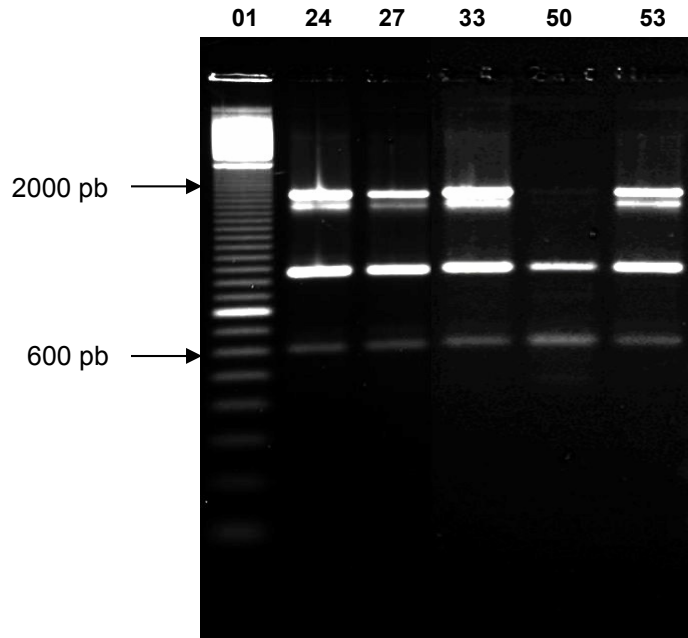
FIGURA 7 – PERFIL DE RAPD-PCR UTILIZANDO INICIADOR OPB-10.



Fotografia de gel de agarose 1,8% com produtos de RAPD-PCR realizado com DNA genômico das leveduras selecionadas. Linha 01: marcador de tamanho molecular 100 pb DNA *ladder* (Invitrogen). Linhas 02 – 07: leveduras selecionadas 24, 27, 29, 50, 53 e 58.

A FIGURA 8 mostra o perfil de quatro bandas encontrado para as reações com o iniciador OPX-01. Foram visualizadas três bandas intensas para as leveduras selecionadas 24, 27, 29, 33, 34, 37, 47, 48, 49, 51, 53, 58, 59 e CK em 2000 pb, 1900 pb e 1100 pb e uma banda de fraca intensidade em 600 pb. Com este iniciador foi possível diferenciar a levedura 50 que contém apenas as bandas de 1100 pb e 600 pb.

FIGURA 8 – PERFIL DE RAPD-PCR UTILIZANDO INICIADOR OPX-01

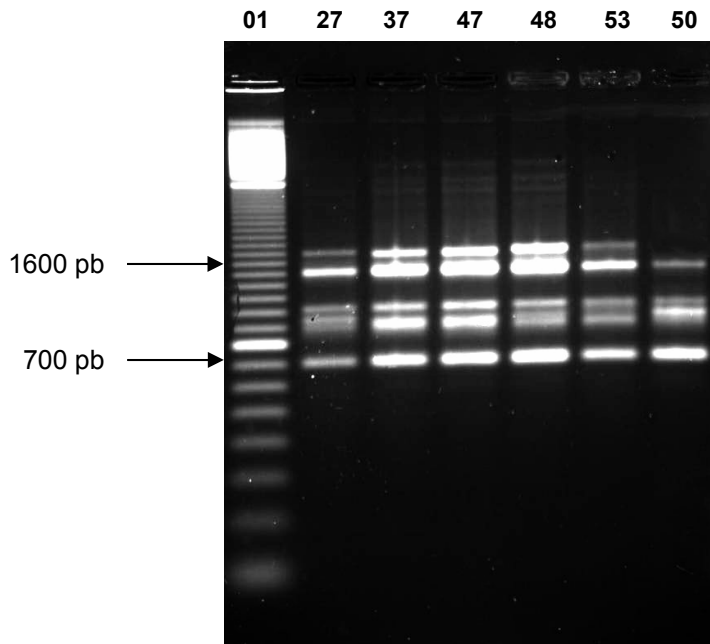


Fotografia de gel de agarose 1,8% com produtos de RAPD-PCR realizado com DNA genômico das leveduras selecionadas. Linhas 01: marcador de tamanho molecular 100 pb DNA *ladder* (Invitrogen). Linhas 02 – 06: leveduras selecionadas 24, 27, 33, 50, 53.

Utilizando o iniciador OPX-03, foram encontrados dois perfis diferentes de bandas, como mostra a FIGURA 9. As leveduras selecionadas e a levedura CK apresentaram um perfil de cinco bandas em 1600 pb, 1500 pb, 100 pb, 900 pb e 700 pb com exceção da levedura 50. Esta levedura foi a única que mostrou perfil no qual a banda de 1600 pb não estava presente.

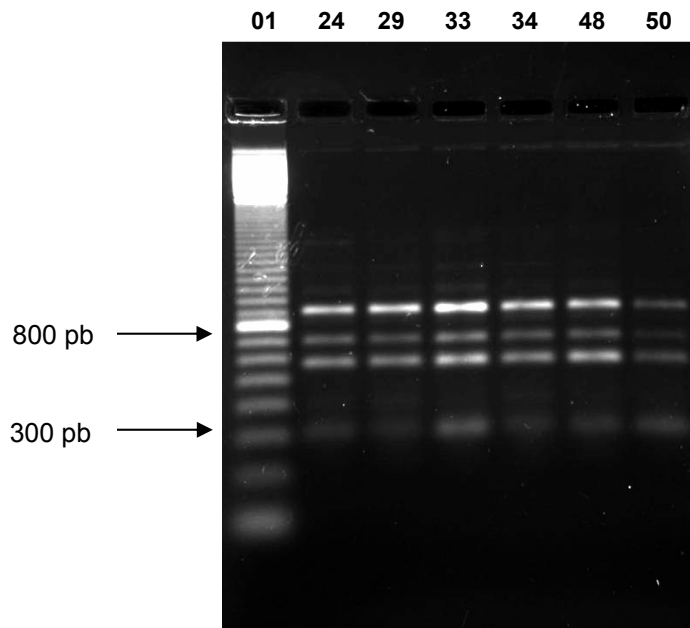
A FIGURA 10 demonstra o padrão de bandas obtido com o iniciador OPX-06 o qual não diferenciou nenhuma das leveduras selecionadas. Todas as leveduras e a levedura CK apresentaram um perfil com quatro bandas sendo três delas intensas com aproximadamente 950 pb, 700 pb e 550 pb e uma banda fraca com 300 pb.

FIGURA 9 – PERFIL DE RAPD-PCR UTILIZANDO INICIADOR OPX-03



Fotografia de gel de agarose 1,8% com produtos de RAPD-PCR realizado com DNA genômico das leveduras selecionadas. Linhas 01: marcador de tamanho molecular 100 pb DNA *ladder* (Invitrogen). Linhas 02 – 07: leveduras selecionadas 27, 37, 47, 48, 53 e 50.

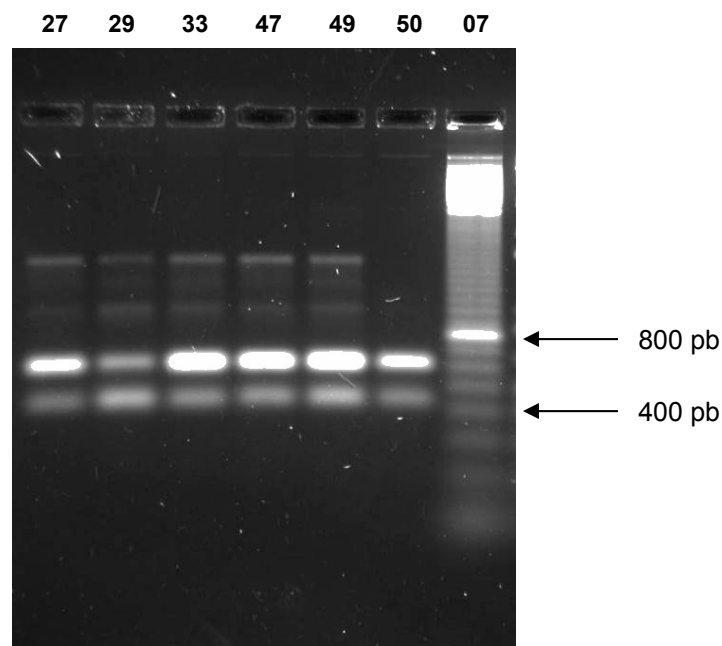
FIGURA 10 – PERFIL DE RAPD-PCR UTILIZANDO INICIADOR OPX-06



Fotografia de gel de agarose 1,8% com produtos de RAPD-PCR realizado com DNA genômico das leveduras selecionadas. Linhas 01: marcador de tamanho molecular 100 pb DNA *ladder* (Invitrogen). Linhas 02 – 07: leveduras selecionadas 24, 29, 33, 34, 48 e 50.

O iniciador OPX-07 diferenciou apenas a levedura 50 que apresentou perfil semelhante ao da levedura CK com duas bandas intensas em 450 pb e 650 pb. As demais leveduras selecionadas apresentaram, com este iniciador, além daquelas, outras duas bandas fracas em 1050 pb e 1600 pb, como mostrado na FIGURA 11.

FIGURA 11 – PERFIL DE RAPD-PCR UTILIZANDO INICIADOR OPX-07

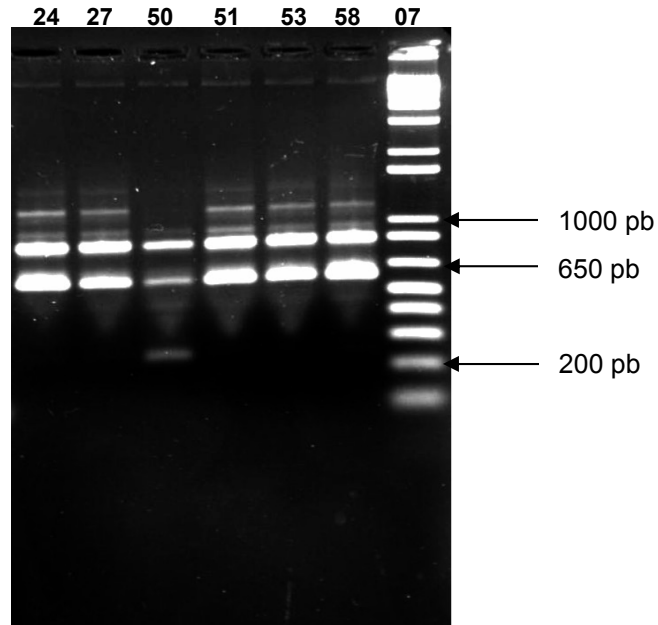


Fotografia de gel de agarose 1,8% com produtos de RAPD-PCR realizado com DNA genômico das leveduras selecionadas. Linhas 01 – 06: leveduras selecionadas 27, 29, 33, 47, 49 e 50. Linha 07: marcador de tamanho molecular 100 pb DNA *ladder* (Invitrogen).

Utilizando o iniciador P-20, foram encontrados dois perfis diferentes de bandas, como mostra a FIGURA 12. As leveduras selecionadas e a levedura CK apresentaram um perfil de três bandas em 1200 pb, 850 pb e 650 pb, com exceção da levedura 50 que não apresentou a banda de 1200 pb.

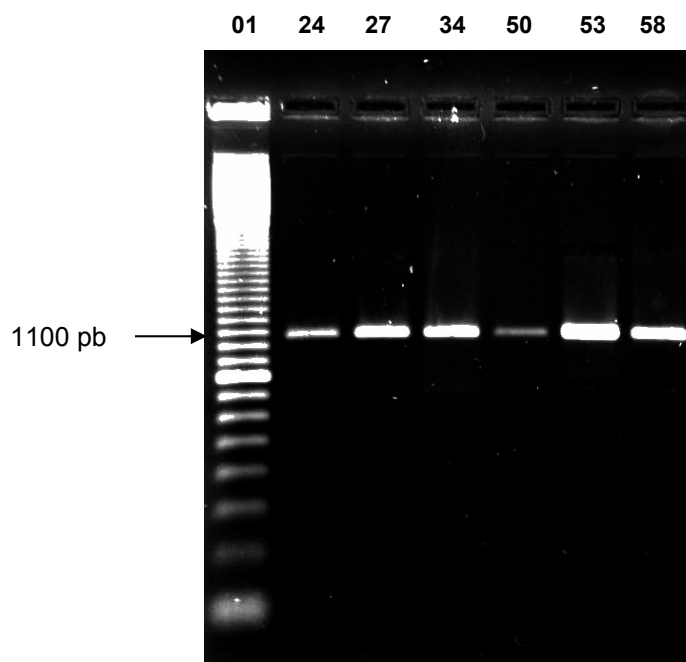
As leveduras selecionadas e a levedura CK apresentaram somente uma banda intensa em aproximadamente 1100 pb quando foi utilizado o iniciador AB1-15, portanto não ocorreu diferenciação como mostra a FIGURA 13.

FIGURA 12 – PERFIL DE RAPD-PCR UTILIZANDO INICIADOR P-20



Fotografia de gel de agarose 1,8% com produtos de RAPD-PCR realizado com DNA genômico das leveduras selecionadas. Linhas 07: marcador de tamanho molecular 1 kb DNA *plus* (Invitrogen). Linhas 01 – 06: leveduras selecionadas 24, 27, 50, 51, 53 e 58.

FIGURA 13 – PERFIL DE RAPD-PCR UTILIZANDO INICIADOR AB1-15



Fotografia de gel de agarose 1,8% com produtos de RAPD-PCR realizado com DNA genômico das leveduras selecionadas. Linhas 01: marcador de tamanho molecular 100 pb DNA *ladder* (Invitrogen). Linhas 02 – 06: leveduras selecionadas 24, 27, 34, 50, 53 e 58.

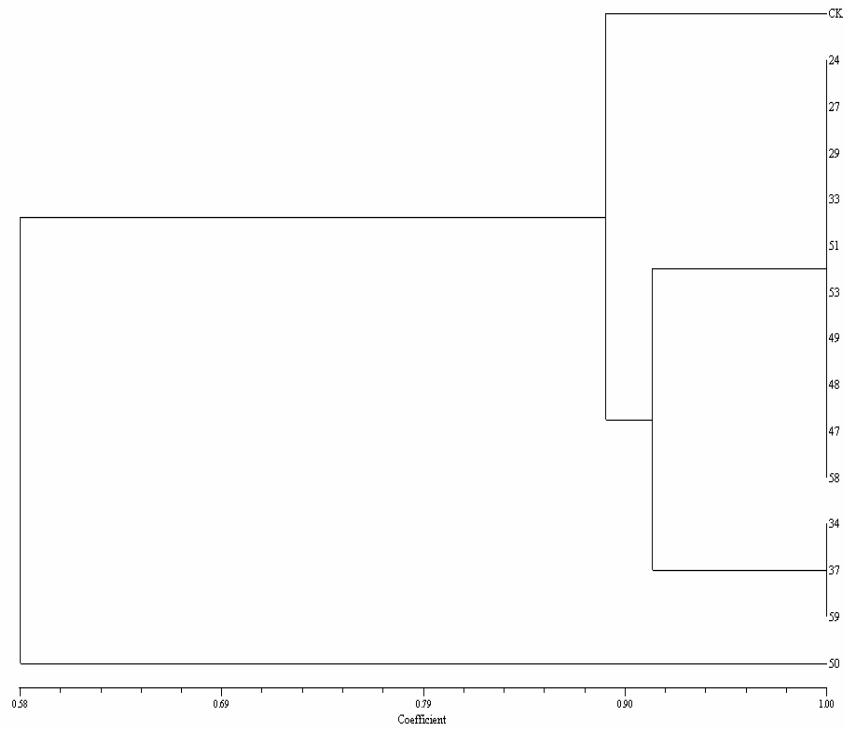
Em resumo, o iniciador OPB-01 foi capaz de diferenciar as leveduras selecionadas em três grupos diferentes, e cinco iniciadores (OPB-12, OPX-01, OPX-03, OPX-07 e P-20) foram capazes de diferenciar a levedura 50 das demais, indicando a presença de polimorfismos genéticos entre estes organismos. Três iniciadores (OPB-10, OPX-06 e AB1-15) não detectaram diferença entre as leveduras e um iniciador (OPB-14) não permitiu amplificação das mesmas.

Os iniciadores geraram um total de 23 bandas utilizadas na construção de uma matriz e a elaboração de um dendograma de similaridade genética entre as leveduras estudadas (FIGURA 14).

As leveduras foram agrupadas em quatro classes das quais duas compreendem apenas um microrganismo (CK e levedura 50); outra as leveduras 24, 27, 29, 33, 47, 48, 49, 51, 53 e 58 e a última com as leveduras 34,37 e 59.

Não foi verificada relação entre a classificação genética das leveduras de acordo com os perfis de RAPD-PCR observados e as características fenotípicas avaliadas.

FIGURA 14 – DENDOGRAMA CONSTRUÍDO A PARTIR DO PERFIL OBTIDO POR RAPD-PCR. (AS SIMILARIDADES FORAM CALCULADAS USANDO O COEFICIENTE DE JACCARD E AS LEVEDURAS FORAM AGRUPADAS PELO MÉTODO UPGMA (ROHLF, 1998))



A FIGURA 14 mostra que as leveduras selecionadas foram inseridas em três grupos: no grupo I as leveduras selecionadas 24, 27, 29, 33, 47, 48, 49, 51, 53 e 58, grupo II leveduras 34, 37 e 59 e no grupo III a levedura 50.

5.6 EXPERIMENTOS DE MICROVINIFICAÇÕES

A transformação do mosto de uva em vinho é um processo fermentativo tradicionalmente conduzido por leveduras. A primeira função destas leveduras é catalisar rapidamente a completa conversão dos açúcares da uva, em particular as hexoses, em etanol, gás carbônico e outros metabólicos secundários importantes (CAPELLO et. al., 2004; BERTHELS et. al., 2004).

Segundo a equação de Gay-Lussac ($C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2 CO_2$) para fermentação alcoólica, o teor de sólidos totais desejável para se obter um vinho com graduação alcoólica de 13 °GL deve ser em torno de 26 g%. Cerca de 90% dos sólidos solúveis de um vinho é composto por açúcares fermentáveis e por isso ele permite o cálculo aproximado do rendimento em álcool (AMERINE; OUGH, 1976). Teoricamente, um determinado peso de açúcar fermentável deve produzir 51,5% (p/p) de etanol (ZOECKLEIN et. al., 2001).

Após a determinação da concentração de açúcares totais no suco de uva constatou-se a presença de 12,1 g% (p/v) de açúcares totais valor insuficiente para obtenção da graduação alcoólica de 10 a 13 °GL a 20 °C estabelecida para vinhos de mesa, segundo a PORTARIA n. 229 do Ministério da Agricultura (1988).

A concentração de açúcar total determinada foi menor que o teor mínimo de sólidos normalmente encontrados em uvas maduras, o qual varia seus valores entre 15 – 19 g% (CHOCIAI et al., 2000). Na safra 2003, DORNELES (2003) obteve um teor de 14,5 g% no suco de uva variedade Terci da região de Colombo. Esta diferença é justificada em decorrência do clima e solo da região, que nem sempre são ideais para cada safra, impedindo a maturação completa do fruto (MIELE; RIZZON; ZANUZ, 1994).

O suco de uva foi corrigido pela adição de sacarose, em quantidade suficiente para obter uma concentração de 28 g% e esterilizado para evitar o crescimento de microrganismos indesejáveis durante a fermentação.

Nos ensaios de microvinificação, as leveduras selecionadas e a levedura CK foram inoculadas no mosto na concentração de $2,53 \times 10^5$ células viáveis/ml

de mosto. Após a adição das leveduras em cada erlenmeyer (tempo zero da fermentação), foram retiradas amostras dos mostos para análises de pH, concentração de açúcares, etanol, glicerol, ácido acético e ácido succínico.

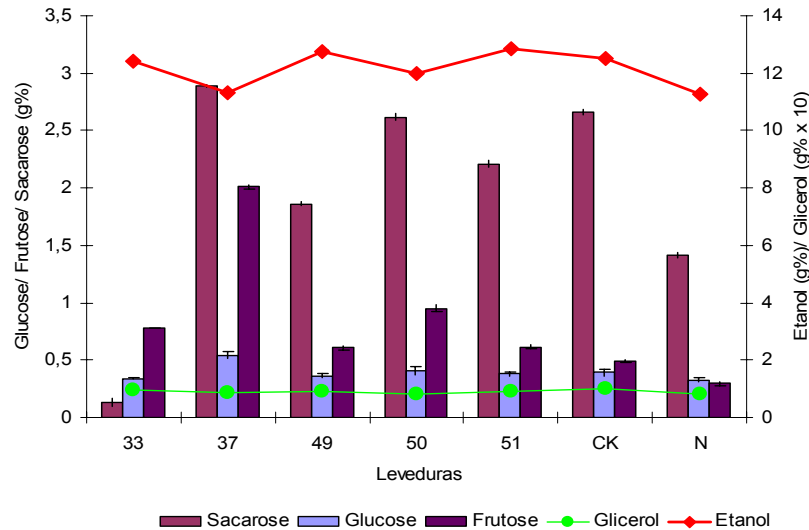
Em termos de pH, no início da fermentação, os resultados encontrados para todos os processos foram praticamente constantes, da ordem de 3,37 a 3,50 e a concentração de açúcares totais obtida foi de 28,49 g%, sendo 10,18 g% de sacarose, 7,87 g% de glicose e 10,44 g% de frutose. A análise de açúcares totais confirmou a concentração de açúcar total necessário para início da fermentação.

Durante a fase tumultuosa da fermentação, foram observadas diferenças entre as leveduras utilizadas. No mosto que continha a levedura selecionada 27, a fase tumultuosa iniciou 15 horas após a inoculação a qual foi visualizada pelo desprendimento de gás carbônico, enquanto nos demais mostos iniciou aproximadamente após 20 horas.

Entre o sexto e sétimo dias os mostos não apresentavam mais a produção de gás carbônico, indicando o final da fase tumultuosa. Na FIGURA 15 estão demonstrados os valores obtidos das amostras retiradas dos processos inoculados com as leveduras 33, 37, 49, 50, 51, CK e leveduras selvagens (N) no sétimo dia de fermentação em relação ao consumo de açúcares, produção de etanol e glicerol. Verifica-se que a glicose foi quase totalmente consumida, restando em torno de 0,5 g%, em todos os processos. No entanto, na presença de frutose as leveduras apresentaram habilidade de consumo diferenciado, uma vez que as concentrações residuais deste açúcar variaram entre 0,29 g% e 2,1 g%. No processo em que se empregou a levedura selecionada 33, foi observado a utilização mais acentuada da sacarose quando comparada com as demais leveduras. O teor de etanol produzido pelas leveduras variou entre 11,3 a 12,9 g% comprovando sua eficácia em fermentar prontamente os açúcares presentes no mosto até obtenção de concentrações de etanol estabelecidas pela legislação brasileira.

O glicerol é outro composto importante no processo de obtenção de vinhos por estar associado a componentes aromatizantes que afetam a qualidade do produto (MAGER e SIDERIUS, 2002). A quantidade de glicerol determinada no sétimo dia da fermentação foi em torno de 1 g/l para todas as leveduras.

FIGURA 15 – CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS, ETANOL E GLICEROL NO PROCESSO FERMENTATIVO, UTILIZANDO LEVEDURAS SELECIONADAS 33, 37, 49, 50, 51, CK E NA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA APÓS SETE DIAS.

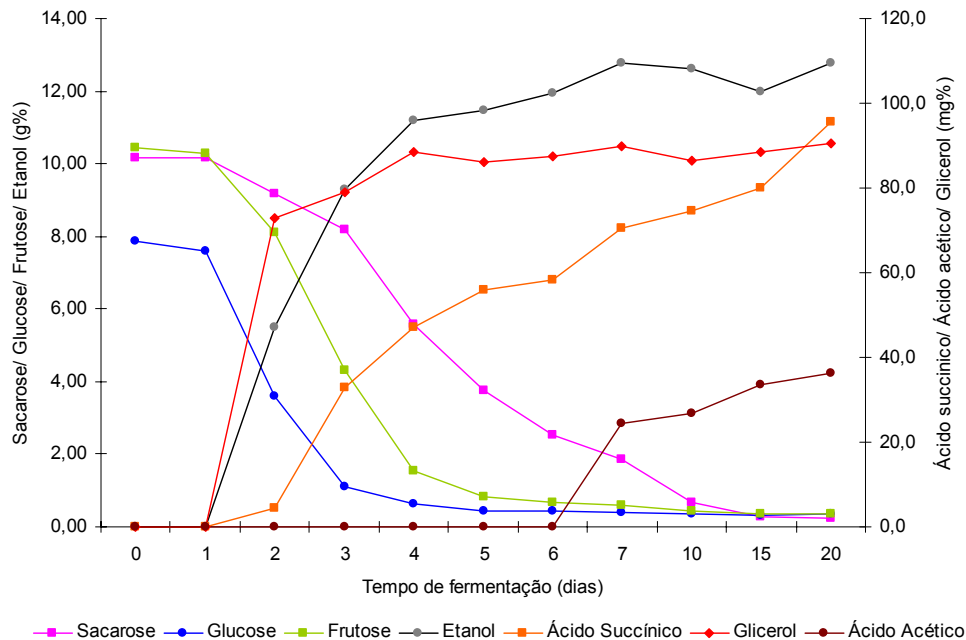


NOTA: CK: Levedura controle *Saccharomyces cerevisiae* variedade *cerevisiae*
 N: leveduras presentes na fermentação espontânea
 Leveduras selecionadas: 33, 37, 49, 50, 51

Os processos fermentativos foram deixados até o vigésimo dia, de acordo com estudos realizados por HOWELL et. al. (2004); IVORRA et. al. (1999); JIMENEZ-CLEMENTE et. al. (2004); ROMANO et. al. (1985); TORIJA et. al. (2002); VILANOVA et. al. (2000) e a temperatura não ultrapassou 28 °C, uma vez que, segundo CHOCIAI et al., 2000, a temperatura não deve ser superior 30 °C, ou segundo PATO (1978), 35 °C.

A FIGURA 16 mostra a habilidade da levedura selecionada 49 no processo fermentativo em função do tempo de fermentação.

FIGURA 16 - CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS, ETANOL, GLICEROL, ÁCIDO ACÉTICO E ÁCIDO SUCCÍNICO NO PROCESSO FERMENTATIVO UTILIZANDO A LEVEDURA SELECIONADA 49 EM FUNÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO (DIAS)



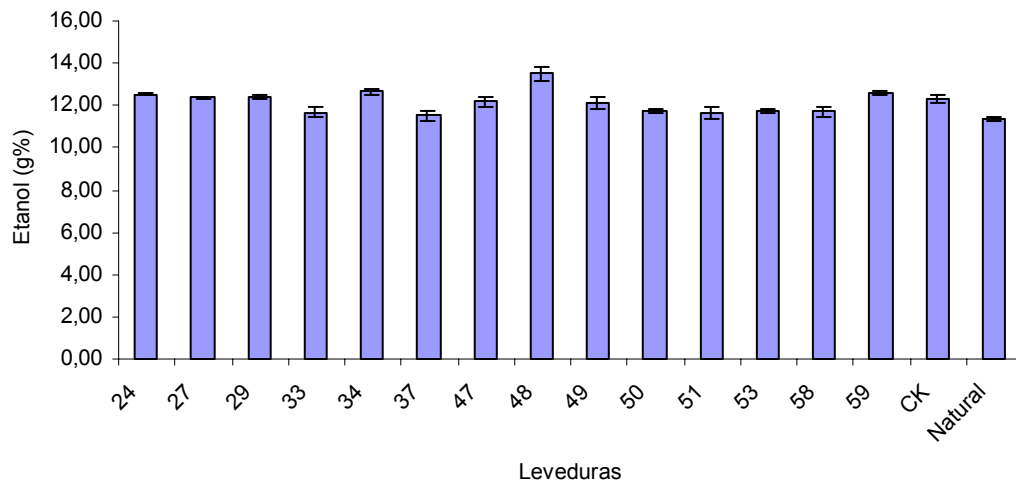
Observa-se no início do processo um baixo consumo de açúcares, e a partir de 24 horas um aumento do consumo de glucose, início da produção de etanol e ácido succínico, além da produção de quase todo o glicerol. No terceiro dia, nota-se que as quantidades de glucose e frutose estão diminuídas e, sendo assim pode-se dizer que a levedura começa a hidrolisar a sacarose para obtenção dos monossacarídeos. Observa-se ainda a estabilização da produção de glicerol ao término do quarto dia e pico de formação de etanol no sétimo dia com posterior estabilização, indicando o término da fase tumultuosa da fermentação. Além disso, verificou-se o início da produção de ácido acético, em pequenas quantidades, a partir do sexto dia.

O mosto de uvas geralmente contém quantidades iguais de glucose e frutose e é sabido que a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em geral, apresenta caráter glicofílico, ou seja, tem preferência pela glucose. Apesar da frutose ser utilizada concomitantemente com a glucose, esta se esgota primeiramente do meio, o que fornece uma discrepância entre a quantidade de frutose e glucose consumida

durante a fermentação. Como conseqüência, o açúcar residual presente na fermentação vínica geralmente contém maior quantidade de frutose que glicose (BERTHELIS, et. al., 2004).

A habilidade fermentativa demonstrada pela levedura selecionada 49 caracteriza o desempenho das demais leveduras selecionadas e levedura CK nos processos fermentativos estudados como demonstram os resultados, relacionados à concentração de etanol, glicerol, ácido acético e succínico, após 20 dias de fermentação, encontrados nas FIGURAS 17 e 18.

FIGURA 17 – CONCENTRAÇÃO DE ETANOL NOS PROCESSOS FERMENTATIVOS UTILIZANDO LEVEDURAS SELECIONADAS, LEVEDURA COMERCIAL E NA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA, APÓS 20 DIAS



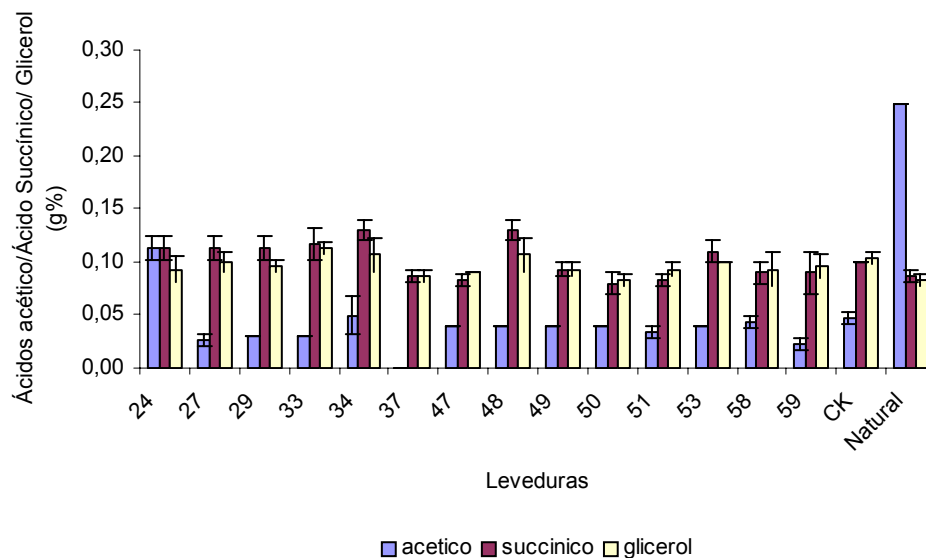
NOTA: CK: levedura controle – UVAFERM – *Saccharomyces cerevisiae* variedade *cerevisiae*
 Natural: leveduras presentes na fermentação espontânea
 Leveduras selecionadas: 24, 27, 29, 33, 34, 37, 47, 48, 49, 50, 51, 53, 58 e 59.

Analisando a FIGURA 17, observa-se no processo conduzido pela levedura selecionada 48 a maior produção de etanol (13,50 g%) e a menor concentração (11,28 g%) na fermentação espontânea. Na maioria dos processos fermentativos utilizando as leveduras selecionadas os valores obtidos foram semelhantes à concentração de etanol produzida pela levedura controle CK (12,33 g%) e quando comparados com os valores determinados no sétimo dia do processo pouco etanol

foi produzido. A concentração de açúcares totais residuais, após 20 dias, nos processos fermentativos foi em torno de 0,7 g% (dados não mostrados na figura).

A dosagem de ácidos orgânicos é feita a fim de se conhecer a composição da fração ácida do vinho, uma vez que esses compostos são, em parte, responsáveis pelas características organolépticas e de estabilidade do produto.

FIGURA 18 - CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO, ÁCIDO SUCCÍNICO E GLICEROL NOS PROCESSOS FERMENTATIVOS UTILIZANDO LEVEDURAS SELECIONADAS, LEVEDURA COMERCIAL E NA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA, APÓS 20 DIAS



NOTA: CK: levedura controle – UVAFERM – *Saccharomyces cerevisiae* variedade *cerevisiae*
 Natural: leveduras presentes na fermentação espontânea
 Leveduras selecionadas: 24, 27, 29, 33, 34, 37, 47, 48, 49, 50, 51, 53, 58 e 59.

O ácido succínico é um produto normalmente durante a fermentação alcoólica em concentrações que variam de 0,4 a 1,3 g/l. Mostos contaminados têm, geralmente, um teor de ácido succínico mais alto que os sãos (ZOCKLEIN et. al., 2001).

O ácido succínico foi produzido em pequenas quantidades, valores entre 0,8 a 1,3 g/l em todos os processos, em concordância com valores usualmente encontrados em vinhos.

O ácido succínico é o principal ácido produzido pela levedura. Sua formação ocorre pela atividade residual de enzimas respiratórias, quando a mitocôndria está reprimida em aerobiose, correspondendo a um processo oxidativo. As razões fisiológicas que levam a levedura a produzir o ácido succínico ainda são bastante discutíveis. Embora a literatura não atribua a formação do ácido succínico a nenhuma necessidade fisiológica da levedura, foi comprovado que se isolando o efeito do pH, o ácido succínico exerce uma ação antibacteriana em efeito sinérgico com o etanol (AMORIM; BASSO; ALVES, 1996).

O ácido acético aparece na fermentação por ação principal do metabolismo bacteriano. No entanto, a levedura é capaz de sintetizá-lo, processo esse, oxidativo. O ácido acético é formado durante a fermentação a partir do acetaldeído e é o principal constituinte da acidez volátil. Baixa acidez volátil é uma boa indicação da sanidade e qualidade do vinho. A acidez total pode ser reduzida pela adição de composto alcalino permitido, mas a acidez volátil não se reduz (AMARANTE, 1986). Geralmente, a concentração de ácido acético não ultrapassa 0,5 a 0,7 g/l (valores de referência 0,2 – 0,7 g/l). Acima desse limite, a ação de bactérias patogênicas ou acéticas deve ser considerada (MENTASTI et. al, 1985; ZOCKLEIN et. al., 2001).

Os processos fermentativos conduzidos pelas leveduras selecionadas 27, 29, 33, 34, 37, 47, 48, 49, 50, 51, 53, 58, 59 e levedura controle CK apresentaram valores de produção de ácido acético dentro do valor de referência, com exceção do processo utilizando a levedura selecionada 24 e do processo espontâneo, os quais alcançaram valores de 1,2 g/l e 2,5 g/l, respectivamente.

A formação de compostos voláteis durante a fermentação alcoólica depende das espécies das leveduras presentes e, em especial, da linhagem destas espécies. Apesar de um grande número de compostos voláteis serem encontrados nas uvas, muitos são formados durante a fermentação viníca. A indústria vinícola tem um grande interesse em leveduras que produzam um único sabor e, para isso, ter conhecimento sobre as diferenças potenciais na produção de voláteis por leveduras isoladas caracteriza uma maneira de seleção da melhor levedura isolada de interesse (PATEL; SHIBAMOTO, 2002).

O glicerol é o composto secundário formado na mesma via de síntese do etanol, competindo com este, motivo pelo qual sua produção é inversamente proporcional a do etanol, causando queda na eficiência fermentativa. A formação de glicerol é função do tipo de levedura, da pressão osmótica do meio, da formação de ácidos orgânicos (succínico e acético) e do crescimento da levedura. O tipo da levedura influencia a produção de glicerol, na medida em que esta é uma característica genética. A espécie *Debaryomyces hansenii*, por exemplo, acumula o glicerol que produz, enquanto que *Sachharomyces cerevisiae* o excreta. A quantidade de açúcar desviado para a formação de glicerol varia até mesmo em nível de linhagens. Além disso, o glicerol é considerado um metabólito osmorregulador, pois sua formação é aumentada em meios com baixa atividade de água (alta pressão osmótica) determinada pela presença de solutos tais como açúcares e sais (OMORI et. al., 1995).

Como pode ser observado na FIGURA 18, em todos os processos fermentativos conduzidos pelas leveduras selecionadas, levedura controle CK e fermentação espontânea foi produzido cerca de 1 g/l de glicerol.

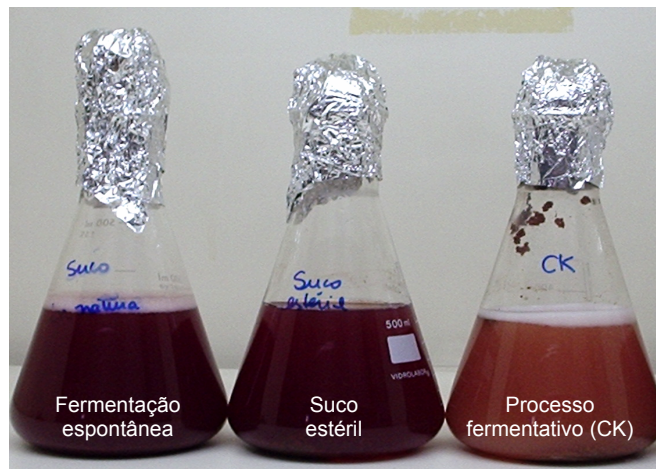
Em vinhos utilizando uvas americanas, encontram-se quantidades de glicerol que variam entre 1,9 a 14,7 g/l. O glicerol pode contribuir para percepção sensorial do corpo em certos tipos de vinho. No entanto, é questionável se esta contribuição é significativa em concentrações de álcool de 10 a 12% que se encontram normalmente os vinhos de mesa (ZOCKLEIN et. al., 2001).

Segundo CAPELLO et. al. (2004) a produção de glicerol por diferentes leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, em mosto esterilizado, resulta bastante diminuída quando comparada com a quantidade de glicerol produzida por leveduras de referência. Em seus estudos, os mostos esterilizados, após serem fermentados por leveduras selecionadas, caracterizaram-se por uma taxa de produção muito baixa de glicerol, variando entre 4,90 a 6,10 mg/l, enquanto os mostos fermentados por leveduras de referência variaram entre 5,96 a 7,16 mg/l.

Os resultados de pH determinados em todos os dias do processo foram praticamente constantes, da ordem de 3,2 a 3,5. Os valores de pH estabelecidos pela Legislação Brasileira para vinhos é de 3,0 a 4,0.

A FIGURA 19 ilustra os controles realizados durante os experimentos de microvinificação: o suco de uva estéril sem adição leveduras, o mosto de uva inoculado com a levedura CK e o experimento de fermentação espontânea.

FIGURA 19 – CONTROLES DA MICROVINIFICAÇÃO: MOSTO DE UVA ESTÉRIL SEM INOCULAÇÃO, MOSTO DE UVA INOCULADO COM A LEVEDURA SECA ATIVA (*Saccharomyces cerevisiae* variedade *cerevisiae* - CK), MOSTO DE UVA SEM INOCULAÇÃO (FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA)



Podemos observar que durante a fase tumultuosa da fermentação, no erlenmeyer com mosto esterilizado sem inoculação não ocorreu formação de espuma, demonstrando a eficiência da esterilização e comprovando que as microvinificações foram conduzidas apenas pela levedura inoculada em cada processo.

- Das 61 leveduras isoladas a partir da micoflora presente nas uvas Terci e etapas do processo fermentativo, foram obtidas 14 leveduras com perfil bioquímico compatível com a espécie *Saccharomyces cerevisiae* e características apropriadas para atender às condições empregadas no processo artesanal de produção de vinho;
- Quando analisadas com os iniciadores específicos SC1 e SC2 as 14 leveduras selecionadas apresentaram uma banda de amplificação de tamanho 1170 pb, característico para espécie *Saccharomyces cerevisiae*;
- De acordo com os perfis de bandas obtidos por RAPD-PCR, as leveduras selecionadas foram agrupadas em 3 grupos diferentes, mas não foram encontradas relações entre a classificação genética das leveduras de acordo com os perfis de RAPD-PCR observados e as características fenotípicas avaliadas;
- As leveduras selecionadas foram capazes de realizar uma fermentação completa, com produção de etanol variando entre 113 a 135 g/l, glicerol em torno de 1 g/l e pequenas quantidades de ácidos acético e succínico;
- A levedura selecionada 27 apresentou características como capacidade de floculação espontânea, produção de pouca quantidade de sulfeto de hidrogênio, tolerância às concentrações de 10%, 13% e 15% de etanol e à temperatura de 37 °C, apropriadas ao processo de produção de vinho.

AMERINE, M. A.; OUGH, C. S. **Análisis de vinos y mostos**. Zaragoza: Ed. Acribia, 1976.

AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G. **Processos de produção de álcool – controle e monitoramento**. 2 ed. Piracicaba: Degaspari Serviços Gráficos, 1996.

AMARANTE, J.O.A., **Vinhos e vinícolas do Brasil**. Summus Editorial Ltda, São Paulo, 1986.

AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. **Biotecnologia: alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Ed. Edgarg Blücher Ltda, v. 5., p. 1-43, 2001.

AUSUBEL, F. M. et. al. **Short protocols in molecular biology**. 4. ed. New York: Wiley, 1999.

BENASSI, M. T. **Metodologia analítica para avaliação de parâmetros físico-químicos e sensoriais de qualidade em vinhos Riesling Itália nacionais**. Campinas, 1997. 150 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas.

BERTHEL, N.J.; OTERO, R.R.C.; BAUER, F.F; THEVELEIN, J.M.; PRETORIUS, I.S. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Sacharomyces cerevisiae* wine yeast strain. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 683-689, 2004.

BLANCO, P. et al. Grape juice biodegradation by polygalacturonases from *Saccharomyces cerevisiae*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 40, p. 115-118, 1997.

BONFIM, T. M. et al. Qualidade do vinho produzido no município de Colombo na safra 2001. **Visão Acadêmica**, v. 3, n. 1, p. 43-48, 2002.

BIER, O. **Bacteriologia e imunologia**. São Paulo: Melhoramentos, p. 838, 1980.

BRASIL. Portaria n. 076, de 27 de novembro de 1986. Estabelece métodos oficiais de análises para destilados alcoólicos, destilados retificados e alcoólicos por mistura. **Diário Oficial da União**, Brasília, 3 dez. 1986. Seção I.

BRASIL. Portaria n. 229, de 25 de outubro de 1988. Aprova as normas referentes a "Completação dos padrões de identidade e qualidade do vinho". **Diário Oficial da União**, Brasília, 31 out. 1988.

- BRITES, A. S. M. **Seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* potencializadas pelo fator Killer, H2S- e o carater floculante**. Piracicaba, 2003. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- CAMARGO, U. A. **Revista do vinho**, v. 2, n. 11, p. 22, 1989.
- CAPELLO, M.S.; BLEVE, G.; GRIECO, F.; DELLAGLIO, F.; ZACHEO, G. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. **Journal of Applied Microbiology**, 97, p. 1274-1280, 2004.
- CARRASCO, P.; QUEROL. A. Analisis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. **Arch microbiology** (175), 450-457, 2001.
- CARRO, D.; PIÑA, B. Identificación de cepas de levadura de interés enológico. **ACE Revista de Enología**, n. 3 2000. Disponível em <http://www.acenologia.com/ciencia52_1.htm> Acesso em 20 out. 2004
- CARVALHO, W. C. Contagem de células sanguíneas. IN____. **Técnicas Médicas de Hematologia e Imuno-Hematologia**. Belo Horizonte: Coopmed editora, p. 73-80, 1994.
- CATALUÑA, E. **Uvas e vinhos**. Rio de Janeiro: Ed. Globo, 1984.
- CHI, Z.; AMEBORG, N. *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance exhibit different adaptive responses to produced ethanol. **Journal of industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p. 75-78, 2000.
- CHOCIAI, M. B. et al. **Elaboração de vinhos**. Curitiba: Imprensa Universitária da UFPR, 2000.
- COBRA, R.Q. **Notas de boas-maneyras e Etiqueta**, 2003. Disponível em <<http://www.cobra.pages.nom.br/bm-vinhosuvras.html>> Acesso em: 22 nov. 2004.
- COLLADO, Q. **Levaduras y la fermentación alcohólica**. 2001. Disponível em <http://www.verema.com> Acesso em: 11 nov 2004
- COMI, G.; CROATTINI, I. The oenological characteristics of commercial dry yeasts. **Journal of Wine Research**, v. 8, n. 2, p. 81-86, 1997.
- CONSTANTÍ, M.; REGUANT, C.; PROBLET, M.; ZAMORA, F.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J.M. Molecular analisis of yeast population dynamics: effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 169-175, 1998.

DAUDT, C.E.; SIMON, J.A. Um método rápido para análise de glicose em mostos e sua quantificação em algumas cultivares do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 697-701, 2001.

DEQUIN, S. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 5-6, p. 577-588, 2001.

DORNELES, D. **Influência do emprego de variedades de *Saccharomyces cerevisiae* na elaboração de vinho tinto de uva Terceira oriunda do Município de Colombo – PR**. Curitiba, 2003. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

ECHEVERRIGARAY, S.; TORESAN-PAESE, S.; CARRAU, J.L. RAPD marker polymorphism among commercial winery yeast strains. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 2000, v. 16, p. 143-146.

EMBRAPA UVA E VINHO, CENTRO NACIONAL DE PESQUISA. Revista do vinho, p. 26-28, jul/ago, 1987.

ESTEVE-ZARZOZO, B.; GOSTINCAR, A.; BOBET, R.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the “El Penedez” area (Spain). **Food Microbiology**, v. 17, p. 553-562, 2000.

FERNÁNDEZ, M.; ÚBEDA, J. F.; BRIONES, A. I. Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 29-36, 2000.

FINN, D.A.; STEWART, G.G. Fermentation characteristics of dried brewers yeast; effect of drying on flocculation and fermentation. **J. Am. Soc. Brew. Chem.** v. 60, n. 3, p. 135-139, 2002.

FOLCH-MALLOL, J.L.; GARAY-ARROYO, A.; LLEDIAS, F. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Latino Americana de Microbiología**. v. 46, n. 1-2, p. 24-46, 2004.

GANCEDO, J.M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 334-361, 1998.

GANGA, M. A.; PIÑAGA, F.; VALLÉS, S.; RAMÓN, D.; QUEROL, A. Aroma improving in microvinification processes by the use of a recombinant wine yeast strain expressing the *Aspergillus nidulans* xlnA gene. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 171-178, 1999.

GASCH, A.P. The environmental stress response: a common yeast response to environmental stresses. Disponível em <http://rana.lbl.gov/~audrey/pdfs/Gasch_ESRreview_Hohmann-Mager.pdf> Acesso em: 10 out. 2004

GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 251-260, 2004.

GIUDICI, P.; KUNKEE, E. The effect of nitrogen deficiency and sulfur-containing aminoacids on the reduction of sulfate to hydrogen sulfite by wine yeasts. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 45, n. 1, p. 107-112, 1994

GONZÁLEZ-PÉREZ, J. A.; GONZÁLEZ, R.; QUEROL, A.; SENDRA, J.; RAMÓN, D. Construction of a recombinant wine yeast strain expressing b-(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification processes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2801-2806, 1993.

GUERRA, C. C.; ZANUS, M. C. **Uvas viníferas para processamento em regiões de clima temperado**. Embrapa uva e vinho sistema de produção, 4, jul. 2003. Disponível em: <http://www.cnpuv.com.br> aceso em 28, jun 2004.

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

HOWELL, K.S.; BARTOWSKY, E.J.; FLEET, G.H.; HENSCHKE, P.A. Microsatellite PCR profiling os *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 315-320, 2004.

IRANZO, J.F.; BRIONEZ-PÉREZ, A.I.; IZQUIERDO-CANÃS, P.M. Study of the oenological characteristics and enzymatics activities of wine yeasts. **Food Microbiology**, v. 15, p. 399-406, 1998.

IVORRA, C.; PÉREZ-ORTIN, J.E.; OLMO, M. An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 64, p. 698-708, 1999.

JIMENEZ-CLEMENTE, J.M.; CAZORLA, L.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, S.; VÁZQUEZ-HERAS, F. J.; VICO-RODRIGUEZ, F. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. **Food microbiology**, v. 21, p. 149-155, 2004.

JIN, Y.L.; SPEERS, R.A. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Research International**, v. 31, p. 421-440, 1998.

JIRANEK, V. LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P. A. Validation of bismuth –containing indicator media for predicting H₂S- producing potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast under enological conditions. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 46, p. 269-273, 1995.

JOSHI, V. K.; PANDEY, A. **Biotechnology: food fermentation**. New Delhi: Educational Publishers & Distributors, 1999. v. 2. p. 647-744.

LAMBRECHTS, M. G.; PRETORIUS, I. S. Yeast and its importance to wine aroma: a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, p. 97-129, 2000.

LILLY, M.; LAMBRECHTS, M.G.; PRETORIUS, I.S. Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 744-753, 2000.

LOPES, C. A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia: a study at different fermentation scales. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 608-615, 2002.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 8 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997.

MAGER, W. H.; SIDERIUS, M. Novel insights into the osmotic stress response of yeast. **FEMS yeast research**, v. 2, p. 251-257, 2002.

MARASCHIN, R. P.; MARASCHIN, M.; CARO, M.S.B.; FRANCISCO, A.; TEIXEIRA, E. Mercado brasileiro de uva y vino. Ayer, hoy y perspectivas. **ACE Revista de Enologia**. 2004. Disponível em < http://www.acenologia.com/ciencia69_1.htm>. Acesso em 07, jan. 2005.

MARTINI, A. Biotechnology of natural and winery-associated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Int. Microbiol.** v. 6, p. 207-209, 2003.

MARTINI, A. Y VAUGHAN-MARTINI, A. Grape must fermentation: past and present. In: *Yeasts Technology*. (Eds. J.F.T. Spencer y M. Spencer) p. 105-123, Springer-Verlag, Berlin, 1990

MATIENZO, P.A. **Re-identificação e caracterização genética da levedura IZ-987 utilizando marcadores moleculares**. Piracicaba, 2002. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

MAURICIO, J. C. et al. The effects of grape must fermentation conditions on volatile alcohols and esters formed by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 75, p. 155-160, 1997.

- MENTASTI, E.; GENNARO, M.C.; SARZANINI, C.; BAIOCCHI, C.; SAVIGLIANO, M. Derivatization, identification and separation of carboxylic acids in wine and beverages by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.** v. 322, p. 177-189, 1985
- MESTRES, M.; BUSTO, O.; GUASCH, J. **Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma.** Journal of Chromatography A, 2000. v. 881, p. 569-581.
- MELLO, L.M.R. **Mercado brasileiro de uvas e vinhos.** Embrapa/CNPUV, Bento Gonçalves, Instrução Técnica 001, 2000.
- MELLO, L. M. R. et al. **Atuação do Brasil no Mercado Internacional de Uvas e Vinhos** - panorama 2003. Artigos Técnicos. Disponível em <www.cnpuv.embrapa.br/atuamerc.html> Acesso em 29 jul. 2004(a).
- MELLO, L.M.R. **Produção e comercialização de uvas e vinhos – panorama 2003.** Artigos Técnicos. Disponível em < <http://www.cnpuv.embrapa.br> > Acesso em 25 jul. 2004 (b).
- MIELE, A.; RIZZON, L. A; ZANUZ, M. C. Avaliação nacional de vinhos - Safra 1993. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 161-169, 1994.
- MORAIS, P.B., ROSA, C.A, LINARDI, V.R., PATARO, C., MAIA, A.B.R.A. Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of the Brazilian sugar-cane aguardent. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 241-243, 1997.
- MYERS, D.K.; LAWLOR, D.T.M.; ATTFIELD, P.V. Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with a high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 145-150, 1997.
- OMORI, T.; TAKASHITA, H.; OMORI, N.; SHIMODA, M. High glycerol producing amino acid analogue-resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutant. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, p. 218-222, 1995.
- ONO, B. I.; ISHI, N.; FUJINO, S.; AOYAMA, I. Role of hydrosulfide ions (HS⁻) in methylmercury resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 11, p. 3183-3186, 1991.
- OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 34-50, 2000.

- PACHECO, A. O. **Iniciação à enologia**. 2ed. São Paulo: Senac Editora, 1999.
- PARISH, M.E. Y CARROLL, D.E. Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grape and musts. **Am. J. Enol. Vitic.** v. 36, p. 165-170, 1985
- PATARO, C., SANTOS, A., CORREA, S.R., MORAIS, P.B., LINARDI, V.R., ROSA, C.A. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in aguardente distillery. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 104-108, 1998.
- PATARO, C.; GUERRA, J. B.; PETRILLO-PEIXOTO, M. L.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; LINARDI, V. R.; ROSA, C. A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 1-9, 2000.
- PATEL, S.; SHIBAMOTO, T. Effect of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* on production of volatiles in Napa Gamay wine and Petite Sirah wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5649-5653, 2002.
- PATO, O. **O vinho, sua preparação e conservação**. 6ed. Lisboa: Livraria Clássica Editora, 1978.
- PELCZAR JR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2 ed. São Paulo: Makron Books do Brasil, 1996.
- PHAFF, H. J. Isolation of yeasts from natural sources. In: LABEDA, D. P. (Ed.) **Isolation of biotechnological organism from nature**. New York: Mc Graw Hill, p. 53-79, 1990.
- PINA, C.; SANTOS, C.; COUTO, J.A.; HOGG, T. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* – influence of different culture conditions. **Food Microbiology**, 21, p. 439-447, 2004.
- PRESCOTT, S.C. **Microbiologia Industrial**. 3. ed. Madrid: Aguilar, S.A. Ediciones, 1962
- PRETORIUS, I. S.; VAN DER WESTHUIZEN, T. J.; AUGUSTYN, O. P. H. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry: a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 20, n. 2, p. 61-74, 1999.
- PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millenium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

PRETORIUS, I. S. Gene technology in winemaking: new approaches to an ancient art. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 66, n. 1, p. 27-47, 2001.

PRETORIUS, I.S.; TOIT, M. du; RENSBURG, P. van. Designer yeasts for the fermentation industry of the 21st century. **Food Technol. Biotechnol.** v. 41, n. 1, p. 3-10, 2003

PROTAS, J.F.S.; CAMARGO, U.A.; MELLO, L.M.R. **A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas**, 2003. Artigos Técnicos. Disponível em <<http://www.cnpuv.embrapa.br>> Acesso em 25 jul. 2004

QUEROL, A.; JIMENEZ, M.; HUERTA, T. A study on microbiological and enological parameters during fermentation of must from poor and normal grapes harvested in the region of Alicante (Spain). **Journal Food Science**, v. 55, p. 1603-1606, 1990.

QUEROL, A.; BARRIO, E.; HUERTA, T.; RAMÓN, D. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2948-2953, 1992.

QUEROL, A.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T.; OLMO, M.; BARRIO, E. Adaptive evolution of wine yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 3-10, 2003 (a).

QUEROL, A.; BELLOCH, C. Molecular evolution in yeast of biotechnological interest. **Int. Microbiol.** v. 6, p. 201-205, 2003 (b)

QUESADA, M.P.; CENIS, J.L. Use of Random amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the characterization of wine yeasts. **Am. J. Enol. Vitic.** v. 46, n. 2, p. 204-208, 1995.

RATÓN, T.O. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 21, p. 15-19, 2004.

REDZEPOVIĆ, S.; ORLIC, S.; SIKORA, S.; MAJDAK, A.; PRETORIUS, I.S. Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. **Letters in Applied Microbiology**. v. 35, p. 305-310, 2002

RIBEIRO, C.A.F.; HORII, J. Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. **Scientia Agrícola**, 1999, v. 56.

- RIZZON, L. A. et al. Diferenciação analítica entre vinhos rosados e tintos da microrregião homogênea vinicultora de Caxias do Sul (MRH 311). **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 6-12, 1992.
- ROHLF, F.J. NTSYSpc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.0, 1998
- ROMANO, P.; SOLI, M.G.; SUZZI, G.; GRAZIA, L.; ZAMBONELLI, C. Improvement of a wine *Saccharomyces cerevisiae* strain by a breeding program. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p. 1064-1067, 1985.
- ROSINI, G., FEDERICI, F. Y MARTINI, A. Yeast flora of grapes during ripening. **Micr. Ecol.** v. 8, p. 83-89, 1982
- SABATÉ, J.; GUILLAMON, J.M.; CANO, J. PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus*/ *Saccharomyces pastorianus* using specific primers. **FEMS Microbiology Letters**, 193, p. 255-259, 2000
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATTIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANNI, A. I.; LONNER, C. Identification of yeasts isolated from Nigerian traditional alcoholic beverages. **Food Microbiology** , v. 10, p. 517-523, 1993.
- SLININGER, P. J.; BOTHAST, R. J.; VAN CAUWENBERGE, J. E.; KURTZMAN, C. P. Conversion of D-xylose to ethanol by yeast *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 24, p. 371-384, 1982.
- STRATFORD, M. Lectin-mediated aggregation of yeasts: yeasts flocculation. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 10, p. 283-341, 1992.
- STRAUSS, M. L. A. et al. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 182-190, 2001.
- SUZZI, G. P.; ROMANO, P.; ZAMBONELLI, C. Flocculation of wine yeasts: frequency, differences and stability of character. **Canadian Journal of Microbiology**. v.30, p. 36-39, 1984.
- THORTON, R.J.; BUNKER, A. Characterization of wine yeasts for genetically modifiable properties. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 90, n. 3, p. 134-145, 1984.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiology**. 6 ed. Califórnia: Art Méd, 2002.

TORIJA, M.J. **Ecologia de levaduras**: selección y adaptación a fermentaciones vínicas. Tarragona, 2002. 260 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili

TORIJA, M. J.; ROZEZ, N.; POBLET, M.; GUILLAMON, J. M.; MAS, A. Effects of fermentation temperature on de strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, p. 47-53, 2003.

TORRIANI, S.; ZAPPAROLI, G.; MALACRINÓ, P.; SUZZI, G.; DELLAGLIO, F. Rapid identification and differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and their hybrids by multiplex PCR. **Letters in Applied Microbiology**. v. 38, p. 239-244, 2004.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. A taxonomic key the genus *Saccharomyces*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 16, p. 113-119, 1993.

VERSTREPEN, K. J.; DERDELINCKX, G.; DELVAUX, F. R.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J. M.; BAUER, F. F.; PRETORIUS, I. S. Late fermentation expression of *FLO1* in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 59, n. 2, p. 69-76, 2001.

VILANOVA, M. et al. Use of PGU1 recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain in oenological fermentations. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 876-883, 2000.

WARD, O. P. Hydrolytic Enzymes. In: BLANCH, H. W.; DREW, S.; WANG, D. I. C. The practice of biotechnology: current commodity products. In: MOO-YOUNG, M. **Comprehensive biotechnology**: the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine. Oxford: Pergamon Press, 1985. p. 819-835.

WALT, J. P. Vander.; YARROW, D. Methods for isolation maintenance, classification and identification of yeast. In: KREGER-VAN RIJ, N. S. W. (Ed). **The yeasts**: a toxonomy study. Amsterdam: Elsevier Science, p.45-104, 1984.

WELSH, J.; RALPH, D.; McCLELLAND, M. DNA and RNA fingerprinting using arbitrary primed PCR. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, I.J. **PCR strategies**. New York: Academic Press, 1995. p. 248-276

XUFRE, A.; SIMÕES, F.; GÍRIO, F.; CLEMENTE, A.; AMARAL-COLLAÇO, M.T. Use of RAPD analysis for differentiation among six enological *Saccharomyces* spp. Strains. **Food Technology and Biotechnology**, 2000, v. 38, p. 53-58.

ZOECKLEIN, B. W.; FUGELSANG, K.C.; GUMP, B.H.; NURY, F.S. **Análisis y producción de vino**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 2001.

ZUZUARREGUI, A.; OLMO, M. Analyses os stress resistance conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection. **Antonie van Leeuwenhoec**, v. 85, p. 271-280, 2004 (a)

ZUZUARREGUI, A.; OLMO, M. Expression of stress response genes in wine strains with differnt fermentative behavior. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 699-710, 2004 (b)