

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS DOM PEDRITO
CURSO DE BACHARELADO EM ENOLOGIA**

LUCAS MARTINS SIMÕES

**CURVA DE CRESCIMENTO DE *SACCHAROMYCES* DURANTE FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA EM VINHO E EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO TOTAL
DIRETAMENTE DO VINHO**

**Dom Pedrito
2014**

LUCAS MARTINS SIMÕES

**CURVA DE CRESCIMENTO DE *SACCHAROMYCES* DURANTE FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA EM VINHO E EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO TOTAL
DIRETAMENTE DO VINHO**

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado ao curso de Bacharelado em
Enologia, da Universidade Federal do
Pampa, como requisito parcial para
obtenção do Título de Bacharel em
Enologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Zocche

**Dom Pedrito
2014**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

S593c Simões, Lucas Martins

CURVA DE CRESCIMENTO DE SACCHAROMYCES DURANTE FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA EM VINHO E EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO TOTAL
DIRETAMENTE DO VINHO / Lucas Martins Simões.

56 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade
Federal do Pampa, BACHARELADO EM ENOLOGIA, 2014.

"Orientação: Fernando Zocche".

1. Importância das leveduras para a enologia. 2.
Características das leveduras. 3. Biologia molecular aplicada
a Saccharomyces e vinho. 4. Curva de crescimento de
Saccharomyces bayanus durante fermentação alcoólica. 5.
Extração de DNA genômico total de levedura. I. Título.

LUCAS MARTINS SIMÕES

**CURVA DE CRESCIMENTO DE *SACCHAROMYCES* DURANTE FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA EM VINHO E EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO TOTAL
DIRETAMENTE DO VINHO**

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado ao curso de Bacharelado em
Enologia, da Universidade Federal do
Pampa, como requisito parcial para
obtenção do Título de Bacharel em
Enologia.

Defendida e aprovada em: ____/____/____

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fernando Zocche
UNIPAMPA

Prof.^a Suziane Antes Jacobs
UNIPAMPA

Enólogo Willian dos Santos Triches
UNIPAMPA

À minha mãe Carmem Helena, pelo esforço para
me fazer vencer e acreditar em meus sonhos.
Minha grande parceira na caminhada da vida!

AGRADECIMENTOS

Agradecer a quem participou de nossa caminhada é um pouco complicado, pois de uma forma ou outra, todos que estiveram ao meu lado contribuíram para que o "Hoje Sonho" se tornasse "Hoje Realidade"! Durante os 4 anos de graduação percebi que o sucesso não é alcançado sem dedicação, mas que depende de querer e fazer acontecer. Que nossos erros são aceitáveis e que, absolutamente, ninguém consegue vencer sozinho. As dificuldades e as responsabilidades aumentaram nas mesmas proporções que os sonhos e a vontade de vencer.

Agradeço a Deus, por ter me dado saúde e determinação. É a força que rege meus passos!

Agradeço à Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, por ter me proporcionado conquistar meus ideais.

Agradeço ao Prof. Dr. Fernando Zocche, pela orientação e confiança, no qual acreditou em meu potencial e transmitiu seus conhecimentos de forma paciente.

Agradeço à Prof^a. Suziane Antes Jacobs, pela oportunidade em participar de seu projeto de doutorado, proporcionando-me uma grande experiência profissional.

Agradeço à veterinária da UNIPAMPA - Campus Dom Pedrito, Anelise Martins, a primeira a me apoiar nas pesquisas com leveduras.

Agradeço aos técnicos Eduardo, Daniele, Cintia, William e Tatiane, pelo apoio ao realizar este trabalho, estando presentes quando necessitei.

Agradeço aos colegas e futuros enólogos, Isadora Cassiano e Pedro Giriboni, pela ajuda nas práticas laboratoriais. Vocês foram meu braço direito!

Agradeço a todos os demais professores, técnicos e colegas que acompanharam minha trajetória, participando ativamente em minha formação profissional e pessoal.

E como não poderia esquecer, agradeço aos meus pais, pela vida e esforços para me fazer ser quem eu sou. A todos meus familiares, amigos e em especial ao Rodi, no qual compartilham comigo os anseios e alegrias, sempre com uma boa taça de vinho. De coração, amo vocês!

RESUMO

As leveduras são constantes alvos de estudo, de modo a tornarem-se um dos organismos mais bem conhecidos, desde sua estrutura até sua síntese bioquímica. Para o setor enológico as leveduras representam grande importância devida sua atuação na transformação dos açúcares em álcool e gás carbônico. Contudo, a biotecnologia moderna possibilita melhorar o desenvolvimento das leveduras, otimizando os processos metabólicos e adequando as características almejadas nos produtos, neste caso, vinhos. Conhecer estes micro-organismos propicia que as atitudes tomadas nas vinícolas sejam mais eficientes, tanto no âmbito físico-químico quanto no sensorial. Há uma tendência mundial que os vinhos sejam elaborados de maneiras mais típicas, onde o emprego de leveduras autóctones vai de encontro com este objetivo. Entretanto, a utilização de leveduras comerciais (geralmente, *Saccharomyces cerevisiae*) garante o sucesso da vinificação, pois evitam que compostos indesejáveis se formem e o consumo dos açúcares seja eficaz. Novas estirpes estão sendo pesquisadas e uma das maneiras mais consistentes de se obter resultados fidedignos são os estudos de todos os processos que envolvem a genética das leveduras, passando pelos transcritos, estes originando as proteínas, sendo estas envolvidas na produção de distintos metabólitos. Este trabalho faz uma ampla abordagem sobre a importância da biotecnologia, discutindo e exemplificando os resultados obtidos por diversos autores ao longo de suas pesquisas. Outro aspecto avaliado é a curva de crescimento das leveduras ao longo da fermentação, sendo elaborado um vinho tranquilo no qual foram feitas contagens diárias sobre a microbiota existente. Do mesmo vinho que foi elaborado retiraram-se amostras para extrair o DNA Total referente a cada período da fermentação alcoólica. A extração de DNA é um dos primeiros passos para que os estudos genéticos sejam feitos, bem como mutações e análises específicas de cada gene. Como resultados, constatou-se que a fermentação ocorreu de maneira eficiente, embora a curva de fermentação tenha sofrido alterações quando comparada a outros trabalhos. Discutiu-se a forma de adaptação das leveduras durante a fermentação alcoólica e quais ferramentas podem auxiliar no processo fermentativo de acordo com cada fase. Em relação à extração de DNA, esta não foi satisfatória devido às condições que o procedimento foi aplicado.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*; Curva de crescimento; Genômica; Extração de DNA.

ABSTRACT

Yeasts are constantly targets of studies, and it makes them one of the most well known organisms, from their structure to biochemical synthesis. Yeasts are very important in the wine industry due their performance in the transformation of sugars into alcohol and carbon dioxide. However, modern biotechnology makes the improvement of yeast cell growth possible, optimizing its metabolic processes which improve desired characteristics in the final product, in this case, wines. With the knowledge that these micro-organisms provide, technical can improve actions taken in the winemaking process, both in the physical and chemical context as in the sensorial characteristics. There is a global trend of making typical wine with the use of indigenous yeasts. However, the use of commercial yeast (typically *Saccharomyces cerevisiae*) ensures the success of wine due to its capacity of preventing the formation of undesirable compounds, ensuring the effective consumption of sugars. New strains have been investigated and the most consistent way to obtain reliable results of the studies are obtained with the knowledge of all processes involving yeasts genetics, through the transcriptions involving specific proteins which are involved in the production of various metabolites. This work is about the importance of biotechnology on this processes, discussing and illustrating the results obtained by various authors through their research. Another aspect evaluated is the growth curve of yeast during fermentation process, through the analysis of wine by daily countings of the existing yeast population on it. From the same wine were collected samples to extract yeast Total DNA at each period of the alcoholic fermentation. DNA analysis is one of the first steps taken in genetic studies, as well as possible mutations and specific analysis of each gene. Results show fermentation occurred efficiently, even though the fermentation curve has changed compared to other researches. It was discussed adaptation form of the yeast cells during fermentation and which tools can enhance this process according to each stage. The DNA extraction was not satisfactory due to the conditions in which the procedure was applied.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; Growth curve; Genomics; DNA extraction.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Desenvolvimentos das leveduras durante fermentação alcoólica associada a produção de álcool estimado.	39
Gráfico 2 - Acompanhamento da fermentação alcoólica através da densidade do mosto/vinho e do álcool provável.....	45
Gráfico 3 - Concentração de Sólidos Solúveis Totais (°Brix) e teor de açucares (°Babo) durante a fermentação alcoólica.	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> vista em microscópio eletrônico.	15
Figura 2 - O funcionamento celular em nível molecular.....	24
Figura 3 – Mosto em fermentação alocado em garrafão de 20 litros de capacidade.....	33
Figura 4 - Mosto em fermentação alcoólica	34
Figura 5 - Repetições experimentais em garrafões de 5 litros de capacidade	34
Figura 6 - Exemplificação sobre o método de diluição de amostras	35
Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% com amostras de DNA total extraído a partir do vinho elaborado	47
Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose (Amostras obtidas do 3º dia de fermentação).....	48
Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose (Amostras obtidas do 5º e 6º dia de fermentação)	48

LISTA DE ABREVIATURAS

CO₂ – Dióxido de carbono

µm – Micrômetro

SO₂- Dióxido de enxofre

H₂S – Ácido Sulfídrico

µg - Micrograma

DNA - ácido desoxirribonucleico

RNA - ácido ribonucleico

OGM – Organismo Geneticamente Modificado

Sc – *Saccharomyces*

PCR - Polymerase Chain Reaction

Pb – Pares de base

NMR - Nuclear magnetic resonance

MS - Mass spectrometry

YEPD - yeast extract peptone dextrose

Lag – Fase de latência

Log – Fase logarítmica

Kb – quilo pares de base

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1.2 Objetivos	14
1.2.1 Objetivos específicos	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Características gerais das leveduras	15
2.2 A importância das leveduras para a indústria enológica	16
2.2.1 Leveduras selecionadas	18
2.2.2 Leveduras autóctones	20
2.3 <i>Saccharomyces</i>	21
2.4 Biologia molecular para estudo de <i>S. cerevisiae</i> em vinhos	22
2.5 Genômica aplicada à <i>S. cerevisiae</i> e vinho	25
2.5.1 <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR)	27
2.6 Transcriptômica aplicada à <i>S. cerevisiae</i> e vinho	28
2.7 Proteômica aplicada à <i>S. cerevisiae</i> e vinho	29
2.8 Metabolômica aplicada à <i>S. cerevisiae</i> e vinho	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Elaboração do vinho	32
3.2 Curva de crescimento das leveduras em fermentação alcoólica	35
3.3 Amostras para a extração de DNA	35
3.3.1 Protocolo de extração de DNA a partir do vinho	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Desenvolvimento das leveduras durante a fermentação alcoólica	37
4.1.1 Fase de latência (LAG)	40
4.1.2 Fase logarítmica (LOG)	41
4.1.3 Fase estacionária	43
4.1.4 Fase de declínio	43
4.2 Consumo dos açúcares durante a fermentação alcoólica	44
4.3 Extração de DNA Total	47
5 CONCLUSÃO	49
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
APÊNDICES	56

INTRODUÇÃO

O vinho difundiu-se como a bebida mais conhecida pela sociedade através dos hábitos milenares de seu consumo e, mais atualmente, dos estudos e pesquisas em prol da melhoria do produto final. Elaborar vinhos envolve uma ampla sequência de transformações bioquímicas, desconhecidas até poucos séculos, onde eram praticamente inviáveis de serem controladas. Com os conhecimentos adquiridos e os avanços (bio)tecnológicos tornou possível obter este controle através de práticas que vão desde o vinhedo, passando pela elaboração do vinho, até sua maturação e envelhecimento.

O vinho é proveniente da fermentação dos açúcares naturais das uvas (glicose e frutose), originando etanol e dióxido de carbono. Este processo deve-se a intensa reprodução de leveduras, naturais ou selecionadas, que possuem a capacidade de metabolizar carboidratos. Entretanto, não somente a transformação de açúcares em álcool e CO₂ é tarefa das leveduras na elaboração de vinhos, mas também agregar compostos aromáticos e sensoriais no produto elevando sua complexidade, entre outras funções.

Estudos afirmam que a origem da elaboração de vinhos remonta as mais antigas civilizações mediterrâneas (ano 7000 a.C.) (TERRAL *et al.*, 2010; BELDA *et al.*, 2014). Porém o conceito de levedura como micro-organismo responsável pela fermentação alcoólica foi descoberto no final do século XIX, a partir das pesquisas de Louis Pasteur e outros investigadores (CHAMBERS & PRETORIUS, 2010; BELDA *et al.*, 2014).

A inoculação de cultivos puros de leveduras selecionadas na elaboração de vinhos foi introduzida por Müller-Thurgau em 1890 (RODRÍGUEZ, 2007; BELDA *et al.*, 2014). Entretanto, desde a década de 1970, a inoculação de culturas puras selecionadas de leveduras no mosto tem melhorado a qualidade dos produtos. Durante a primeira metade do século XX as leveduras do vinho eram selecionadas de forma quase empírica utilizando os métodos de genética clássica. A evolução da engenharia genética trouxe a possibilidade de mudanças nas características das leveduras com grande precisão e estabilidade fenotípica.

As técnicas de DNA recombinante proporcionaram um grande avanço no campo da genética molecular, fisiologia e biotecnologia, possibilitando a construção de cepas comerciais alternando a expressão de genes (super-expressão ou deleção de genes) (PRETORIUS & HOJ, 2005). Estas descobertas e adaptações elevaram substancialmente a qualidade dos vinhos, originando produtos com maior estabilidade microbiológica e distintas características sensoriais superiores.

Atualmente, sabe-se que a fermentação alcoólica e malolática são grande parte do sucesso dos processos de vinificações. Neste sentido, muitos estudos são realizados ao longo de anos para se tentar compreender e avaliar os micro-organismos envolvidos na elaboração do vinho, aspectos de sua biologia, especificadamente a fisiologia, e suas capacidades de interação com o meio e com as outras espécies. O somatório desses achados contribui para que os processos de fermentações inoculadas fiquem cada vez mais eficientes e produzam vinhos com qualidade sensorial aceitável e seguramente reproduzível (AMARANTE, 2005; SANTOS *et al.*, 2008).

Desta forma, para uma excelente vinificação faz-se necessário o conhecimento dos micro-organismos agentes das transformações bioquímicas no vinho, bem como é compulsório o conhecimento dos efeitos proporcionados a partir da estrutura genética e metabólitos produzidos por estes micro-organismos. Salienta-se que há diversas alternativas de incrementar e/ou diferenciar o vinho de maneira eficaz e segura. Assim, a utilização de leveduras específicas, não somente asseguram a qualidade do vinho como também podem ser agentes aliados para o aumento da tipicidade do produto.

1.2 Objetivos

Revisar os aspectos genéticos do gênero *Saccharomyces* envolvidos no processo de fermentação alcoólica de vinhos, principalmente *S. cerevisiae* e *S. bayanus*.

Quantificar as células de leveduras *S. bayanus* presentes em vinhos através do crescimento padrão em placas e também através da extração do material genético (DNA) diretamente do mosto/vinho, como forma de acompanhamento da fermentação alcoólica e do pleno desenvolvimento deste micro-organismo.

1.2.1 Objetivos específicos

Fazer uma revisão bibliográfica demonstrando o "Estado da Arte" da biotecnologia enológica aplicada ao desenvolvimento de leveduras e vinhos. Acompanhar a fermentação alcoólica com estabelecimento da curva de crescimento de *Saccharomyces bayanus*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características gerais das leveduras

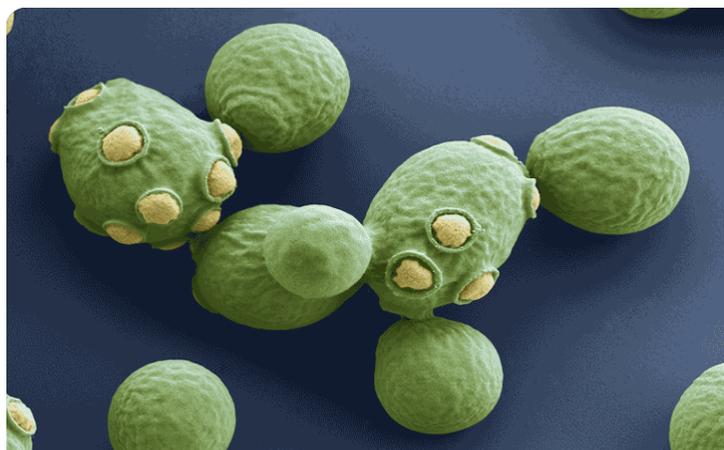
A etimologia da palavra levedura tem origem no termo latino *levare* com o sentido de crescer ou fazer crescer, pois as primeiras leveduras descobertas estavam associadas a processos fermentativos como o de pães e de mostos que provocam um aumento da massa do pão ou do volume do mosto pela liberação de gás e formação de espuma. As leveduras têm sido intensivamente estudadas, tanto na biologia celular quanto na molecular, como modelos eucarióticos, e comparadas com a *Escherichia coli* como modelo procariótico (SANTOS, 2009).

As leveduras são fungos unicelulares eucarióticos pertencentes ao reino *Fungi* (principalmente as classes *Ascomycetos* e *Basidiomicetos*), se multiplicam assexuadamente por brotamento ou fissão binária e o tamanho de uma célula individual varia de 20 a 50 µm de comprimento e 1 a 10 µm de largura (KAVANAGH, 2011; BARRERA, 2013).

A estrutura de uma levedura é representada através de uma célula eucariótica típica, sendo que suas características morfológicas dependem de cada espécie. Em geral, apresenta forma ovoide, contudo pode se encontrar leveduras alongadas, esféricas, em forma de pera ou limão ou até mesmo triangular. Em cultura puras pode ser observado que existe uma variação no tamanho e forma de células.

Essas diferenças dependem da idade da cultura e do ambiente onde estão. Não possuem flagelos ou outro órgão de locomoção e alguns podem ter um material composto por polissacarídeo viscoso, em torno da célula (GARCÍA, 2004; BARRERA, 2013). A estrutura típica de *Saccharomyces cerevisiae* pode ser melhor observada na Figura 1.

Figura 1 - *Saccharomyces cerevisiae* vista em microscópio eletrônico.



Fonte: Microbiology online, 2014.

A faixa de tolerância de pH inerente ao bom crescimento das leveduras varia entre 2 e 8, geralmente crescendo em temperaturas na faixa de 0 a 50 °C. Porém, as temperaturas ótimas de crescimento estão compreendidas entre 20 e 30 °C. As leveduras podem se desenvolver em meio com concentrações relativamente elevadas de solutos, havendo também um tolerante grupo de leveduras ainda mais resistentes, chamadas de osmofílicas (GARCÍA, 2004; BARRERA, 2013). Exemplo disto é o pleno desenvolvimento das leveduras em mostos, este apresentando alta concentração de açúcares.

2.2 A importância das leveduras para a indústria enológica

A inoculação de leveduras selecionadas para elaboração de vinhos é muito utilizado atualmente, evitando o desenvolvimento de micro-organismos contaminantes que poderão afetar negativamente no consumo total dos açúcares e na qualidade do produto final. Todavia, Medina *et al.* (2012) destaca que estirpes selecionadas não suprimem completamente as leveduras de início de fermentação, ou seja, ainda permanece a microbiota autóctone, com origem nas próprias uvas.

A transformação do mosto da uva em vinho é um processo microbiano e como tal, é importante que o enólogo conheça as leveduras e a bioquímica da fermentação como base fundamental para a profissão. A fermentação alcoólica (processo de conversão dos principais açúcares da uva, glicose e frutose, em etanol e dióxido de carbono) é realizada por leveduras do gênero *Saccharomyces*, em geral *S. cerevisiae* e *S. bayanus* (BOULTON *et al.*, 2002).

Sabe-se que, pelo menos para o vinho a linhagem da levedura presente no processo de fermentação é de crucial importância para as características do produto final. Especialmente importante para a manutenção da qualidade do produto é que este seja o resultado de uma fermentação por uma cepa capaz de predominar no processo (VICENTE, 2007). É importante identificar os gêneros e espécies de leveduras relacionadas com o vinho para compará-las entre si e sua contribuição ao vinho ou a uma vinícola, para prevenir problemas que possam aparecer durante a fermentação e deterioração microbiana, avaliando as diferentes leveduras para inóculo (BOULTON *et al.*, 2002).

Rankine (2000) e Schuler & Casal (2006) relatam que dentre as principais características preconizadas pelas leveduras selecionadas para a elaboração de vinhos, estão:

- Vigor da fermentação: Quantidade máxima de etanol (% , v/v) produzido em fim de fermentação. Desejável: boa produção de etanol;

- Taxa de fermentação: Gramas de CO₂ produzido no decurso das primeiras 48 horas da fermentação. Desejável: início rápido da fermentação;
- Modo de multiplicação em meio líquido: Crescimento disperso ou floculante, velocidade de sedimentação. Desejável: Multiplicação de leveduras dispersa durante a fermentação, ocorrendo sedimentação no seu final;
- Produção de espuma: Altura de espuma produzida durante a fermentação. Não desejável: produção excessiva de espuma;
- Ótimo de temperatura de fermentação: Termotolerância e criotolerância estão relacionadas com as propriedades enológicas. A temperatura ótima de fermentação situa-se entre 18 e 28°C;
- Acidez volátil ou produção de ácido acético: As estirpes selecionadas não devem liberar mais de 100 a 400 mg.L⁻¹ durante a fermentação. Não desejável: produção em excesso;
- Degradação ou produção de ácido málico: O aspecto desejável ou não da produção ou degradação dependem das características do mosto. A degradação de ácido málico varia entre 0 e 20% em função da estirpe de *S. cerevisiae*;
- Produção de glicerol: Subproduto favorável e significativo da fermentação (5 a 8 g.L⁻¹) contribuem para o aumento da doçura, corpo e volume do vinho;
- Produção de acetaldeído: Metabólitos favoráveis no caso do Jerez¹, vinho de sobremesa e porto; critério importante de seleção para as estirpes destinadas à maturação do vinho. Também favorece na combinação dos compostos, fazendo com que a cor e a estrutura perdurem;
- Ésteres, álcoois superiores e compostos voláteis: Metabólitos favoráveis que influenciam fortemente o aroma do vinho de acordo com determinadas quantidades, estando dependentes da presença de precursores ligados à casta ou à maturação da uva. Quantidades limitadas contribuem positivamente para as características sensoriais globais;
- Tolerância e produção de SO₂: Agente antioxidante e antimicrobiano. Desejável: capacidade e vigor fermentativo elevado em presença de teores de SO₂ usuais em enologia. Não Desejável: produção excessiva de SO₂;

¹ Jerez é o vinho elaborado na presença de leveduras em sua fase de maturação em barricas, no qual fica em contato com o oxigênio e desenvolve características únicas (GIRARD, 2008).

- Produção de H₂S: Determinada por coloração de colônias formadas em meio indicador à base de bismuto de sulfito. O H₂S é prejudicial à qualidade do vinho, é um dos defeitos com um nível de detecção muito baixo (50 a 80 µg.L⁻¹). Tem aroma característico de ovo podre;
- Resistência ao estresse: Tolerância aos estresses ácidos e osmóticos combinados;
- Resistência ao cobre: Fortes concentrações em cobre podem originar paragens de fermentação. Desejável: Forte resistência ao cobre e capacidade de reduzir o teor em cobre;
- Começo rápido da fermentação: Permitindo o uso efetivo de recipientes para a fermentação em tempos mais curtos;
- Fermentações precisas e controláveis: Evitando contaminações e paradas de fermentação.
- Conversão eficiente dos açúcares das uvas em álcool: açúcares residuais fermentáveis podem estimular o desenvolvimento de micro-organismos contaminantes, interferindo na estabilidade microbiológica do vinho;
- Características de floculação previsíveis em certas condições: enfoque na elaboração de vinhos espumantes, o que não permitirá a sedimentação das leveduras no vidro da garrafa.

A importância da função das leveduras e sua influência na composição química dos vinhos foram comprovadas através do estudo de diversas vinificações utilizando diferentes cepas de *S. cerevisiae* aplicadas em mostos semelhantes. Este feito indica que a qualidade final de um vinho é resultante da interação entre levedura e mosto (UGLIANO *et al.*, 2006; SWIEGERS *et al.*, 2007; LOSCOS *et al.*, 2007; ÁLVAREZ-PÉREZ *et al.*, 2012; BELDA *et al.*, 2014). Sendo a complexidade aromática afetada pela cepa escolhida para o processo de fermentação alcoólica e a maturação sobre as borras finas *sur lie*².

2.2.1 Leveduras selecionadas

Culturas *starters* ou culturas iniciadoras de fermentação consistem na seleção de micro-organismos de alimentos com atividade metabólica estável e conhecida, portadores de outras características utilizadas para produzir alimentos e bebidas fermentadas de aparência,

² *Sur lie* é o tempo em que os restos celulares das leveduras ficam em contato com o vinho, onde ocorre degradação da parede celular e a liberação das manoproteínas e outros constituintes, o que melhora as características sensoriais (DARRICARRÈRE, 2006).

corpo, textura e sabor desejáveis (RAY, 2004; SANTOS *et al.*, 2008). Atualmente esse termo abrange as formas de micro-organismos fermentadores inoculados ao meio também com função protetora contra espécies contaminantes (SANTOS *et al.*, 2008; GERBAUX *et al.*, 2009). A “função protetora” conferida pelas leveduras selecionadas está relacionada à capacidade destas leveduras competirem por substrato ou, até mesmo, elaborarem substâncias que possam ser tóxicas às bactérias e às leveduras não selecionadas.

As cepas de leveduras comerciais proporcionam início rápido da fermentação, continuidade no processo e repetibilidade ao produto. Devem ser adquiridas unicamente de provedores credenciados que controlem a viabilidade, contaminação e mutação das mesmas (RANKINE, 2000). No entanto, nem sempre as espécies selecionadas de ambientes naturais para iniciar um processo fermentativo portam todas as características desejáveis para o sucesso da fermentação. Desse modo, justifica-se o desenvolvimento de um longo trabalho dos cientistas para estudar os aspectos pormenorizados de micro-organismos fermentadores e de novas tecnologias de estudo de cepas com potencial enológico (SANTOS *et al.*, 2008).

Como exemplo do impacto da seleção de leveduras para vinificação podem ser citadas a maioria das cepas de leveduras comerciais disponíveis no mercado. Geralmente essas leveduras selecionadas requerem a adição de sais de amônio como fonte de nitrogênio, pois não foram adaptadas às condições naturais que constituem as uvas e o mosto que possuem entre 100 a 250 mg.L⁻¹ de nitrogênio assimilável.

Entende-se, que num processo de vinificação o excesso de nitrogênio deve ser evitado, pois a disponibilidade de nitrogênio dada pela degradação incompleta pelas leveduras pode promover a formação de compostos de risco para a saúde humana, como carbamato de etilo, e o aumento de resíduos de aminoácidos tais como histidina, precursor de histamina (alergênico). Além disso, o nitrogênio residual pós-fermentação alcoólica facilita o desenvolvimento de micro-organismos contaminantes durante a maturação, enfatizando o desenvolvimento de levedura *Brettanomyces*, cuja presença também pode dificultar o controle da fermentação alcoólica, ocasionando perda nas características sensoriais do produto (MEDINA *et al.*, 2007; BARRERA, 2013).

É de fundamental importância a compreensão que o processo de absorção de nitrogênio pela levedura é limitado pelo etanol produzido pelos próprios micro-organismos. Nesse sentido, uma levedura selecionada que suporte maiores teores alcoólicos durante a fermentação alcoólica também tem sua fisiologia adaptada para melhor absorver o nitrogênio, com efeitos benéficos ao vinho que está sendo elaborado. Outro aspecto relevante na utilização de leveduras selecionadas é o fator *killer* que estas possuem, sendo de extrema

importância para que a estirpe selecionada possa se desenvolver com rapidez, inibindo o crescimento de contaminantes ou micro-organismos que não agreguem benefícios ao vinho. Assim, o início da fermentação torna-se mais eficaz e há menores possibilidades na perda de qualidade do produto.

2.2.2 Leveduras autóctones

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 diferentes ao longo da fermentação (TORIJA, 2002).

A microbiota autóctone é aquela naturalmente presente nas uvas e inclui espécies dos gêneros *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces* ou *Metschnikovia*. Encontram-se em elevada concentração na superfície de uvas sãs (10^4 - 10^6 células/cm²), e são responsáveis pelo início da fermentação alcoólica. Comparativamente, a levedura fermentativa por excelência, *Saccharomyces cerevisiae*, encontra-se em concentração muito baixa no início da fermentação, mas devido à sua elevada tolerância ao etanol consegue rapidamente predominar após os primeiros dias (cerca de 1 a 4 dias) do processo, sendo geralmente a única espécie de levedura encontrada no final da fermentação (CASAL *et al.*, 2004).

A fermentação espontânea acontece quando não se adiciona cultivos iniciadores de forma intencional e realiza-se a adição de pequenas doses de dióxido de enxofre, permitindo o desenvolvimento da microbiota autóctone o que pode contribuir para as características sensoriais do vinho. Torna-se aceitável, quando há acréscimo de complexidade ao vinho, ou inaceitável ao ponto de diminuir a qualidade, dependendo sobre tudo da variedade da uva, do tipo de vinho e da microbiota realmente presente durante a fermentação (BOULTON *et al.*, 2002).

Para o controle da fermentação é possível empregar leveduras selecionadas (ou culturas de leveduras). Esta prática, porém, vai de encontro ao respeito pelo *terroir*³. Os produtores de grandes vinhos compreenderam a importância da utilização de leveduras

³ Terroir é revelado, no vinho, pelo homem, pelo saber-fazer local. Opõe-se a tudo que é padronização. É a interação entre manejo no vinhedo, práticas de elaboração e características únicas de determinado produto (TONIETTO, 2007).

autóctones como elemento diferencial e exclusivo para obtenção de maior complexidade aromática e gustativa (POUSSIÉ, 2010).

Quando se opta em adicionar uma cepa específica de levedura esta irá predominar e reprimir a microbiota autóctone, permitindo um melhor controle da microbiologia do processo e conseqüentemente uma fermentação rápida e previsível, que se traduz na qualidade reprodutível do produto final, o vinho. Estas práticas evitam também paradas (“amuos”) na fermentação, que se verificam por vezes em fermentações espontâneas, por exemplo, em consequência do uso excessivo de fungicidas durante a maturação das uvas (CASAL *et al.*, 2004).

Uma fermentação realizada por leveduras autóctones pode contribuir para a tipicidade do vinho. Entretanto apresenta riscos de contaminações microbiológicas ligadas a higiene da vinícola e das características químicas dos mostos (GIRARD, 2004). De acordo com Zoecklein *et al.* (2001) a elaboração de vinhos utilizando leveduras autóctones agrega maior complexidade e intensidade, assim como uma estrutura ao paladar mais cheia e redonda. Ressaltando a validade de se identificar novas leveduras que possam vir a ser específicas de uma determinada região e produzam vinhos com diferenças interessantes e singulares.

2.3 *Saccharomyces*

O gênero *Saccharomyces* compreende 14 espécies. De interesse biotecnológico há 4 espécies que se destacam: *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus* e *S. paradoxus*. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* têm aproximadamente 5 a 10 µm de diâmetro. Sendo que a sua reprodução assexuada é de ocorrência mais comum. Uma das características principais nesta reprodução é o fato de os novos organismos serem geneticamente idênticos (clones) aos “progenitores” que lhes deram origem (BURKE *et al.* 1998; SANTOS, 2009).

O estágio final da fermentação espontânea é, invariavelmente, dominado pelo grupo de leveduras álcool-tolerantes (*Saccharomyces sensu stricto*), o que justifica os intensos estudos e investimentos para melhoria destas espécies. 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 *Brettanomyces*, *Schyzosaccharomyces*, *Torulaspóra* e *Zygosaccharomyces*, também podem estar presentes durante a fermentação e podem se desenvolver (REDZEPOVÍC *et al.*, 2002).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido utilizada rotineiramente em muitos processos biotecnológicos tradicionais, incluindo panificação e produção de várias bebidas alcoólicas. Consequentemente tem sido extensivamente estudada e assim, é considerado um sistema de modelo para os efeitos metabólicos, análise molecular e genética de organismos eucarióticos. Devido ao seu status de GRAS (definição à segurança alimentar e científica), leveduras *S. cerevisiae* também são aplicadas em larga escala em processos dirigidos à biomassa, tais como a produção de fermento, extrato de levedura e outros aditivos alimentícios (vitaminas, proteínas, enzimas e agentes aromatizantes) (BEKATOROU *et al.*, 2006).

2.4 Biologia molecular para estudo de *S. cerevisiae* em vinhos

S. cerevisiae durante muito tempo foi utilizada empiricamente como organismo fermentador de mosto de uvas. As atuais técnicas moleculares para estudo desta levedura permitiram dividir, didaticamente, os “momentos celulares” que podem afetar a levedura e, conseqüentemente, os vinhos. Para melhor compreensão destes processos, são descritas, a partir de revisão bibliográfica, análises dos efeitos proporcionados ao vinho dos testes executados com ácidos nucleicos (DNA e RNA – genômica e transcriptômica, respectivamente), proteínas (proteômica) e metabólitos produzidos (metabolômica). Etimologicamente, ômica tem origem na palavra "*Omics*" que significa o estudo global de algo. Assim, a genômica entende-se pelo estudo de todos os genes, a transcriptômica de todos os transcritos (RNA), a proteômica de todas as proteínas, e por fim, a metabolômica o perfil metabólico de uma dada célula, tecido, fluido, órgão ou organismo num dado instante (NIELSEN *et al.*, 2005; SANTOS, 2009).

Durante as décadas de 80 e 90, foi investido muito tempo e esforço no sequenciamento do código genético de diversos organismos, com o intuito de se elucidar completamente o mecanismo de funcionamento celular em nível molecular. No entanto, após todo este esforço, ficou evidente que o conhecimento das sequências de todos os genes de um organismo não é suficiente para se entender todos os mecanismos moleculares de uma célula. Por esta razão, na era pós-genômica, ou era pós-sequenciamento, os cientistas estão recorrendo à bioquímica clássica para buscar ferramentas que auxiliem na elucidação da função dos milhares de genes que foram sequenciados, mas que permanecem com a função desconhecida (VILLAS-BÔAS *et al.*, 2006).

Como consequência, surgiu uma nova área nas ciências biológicas, conhecida como Genômica Funcional, que tem como objetivo primordial determinar funções para os diversos

genes sequenciados. Basicamente, a função de um gene é determinada quando são identificados os seus respectivos produtos gênicos, ou seja, RNAm, proteínas e metabólitos (VILLAS-BÔAS *et al.*, 2006).

Durante décadas as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foram os primeiros organismos mais bem caracterizados sob o ponto de vista genômico e fisiológico (PISKUR *et al.*, 2004; SANTOS, 2009). Esta levedura possui aproximadamente 6.200 genes, 20.000 tipos de RNAm, além de 500.000 proteínas, sendo que o conjunto destas partes celulares originaram cerca de 590 distintos metabólitos (FORSTER *et al.*, 2003; PISKUR *et al.*, 2004; SANTOS, 2009).

O genoma de *S. cerevisiae* foi o primeiro genoma eucariótico a ser sequenciado e será provavelmente o primeiro organismo a ter revelado os seus constituintes transcriptômicos, proteômicos e metabolômicos. Dado o fato de numerosos aspectos fisiológicos estarem sujeitos a uma regulação multigene complexa (organização dos genes em *clusters*⁴ ou genes que tenham regulação conjunta), a compreensão do processo de expressão dos genes no decurso da fermentação do vinho contribuirá para o conhecimento da composição genética das estirpes de leveduras comerciais e influenciará o melhoramento das estirpes enológicas através da engenharia genética. Estas abordagens são também as mais adaptadas para demonstrar que as alterações introduzidas não originam efeitos colaterais inesperados ou adversos, como por exemplo, a produção de substâncias tóxicas (SCHULER & CASAL, 2006).

A informação obtida através da análise dos genomas completos, transcriptomas, proteomas e metabolomas das leveduras enológicas irá aumentar, sem dúvida, a especificidade dos correntes métodos com os quais as estirpes de arranque de fermentação são geneticamente selecionadas para a produção de tipos e de estilos de vinhos particulares. Contudo, a engenharia genética continua a ser o único método viável que oferece a possibilidade de alterar uma característica enológica existente, introduzir uma característica nova e de eliminar uma característica indesejada sem afetar adversamente outras propriedades desejáveis (PRETORIUS, 2003).

Conforme avança o conhecimento sobre o vinho através da funcionalidade das leveduras e seu possível controle biotecnológico, estão surgindo novas linhas de pesquisas, pretendendo manter o equilíbrio biológico inerente ao processo de vinificação. Isto se deve a

⁴ Cluster é compreendido como agrupamento de genes distintos numa mesma região do genoma. (Ferreira, 2001).

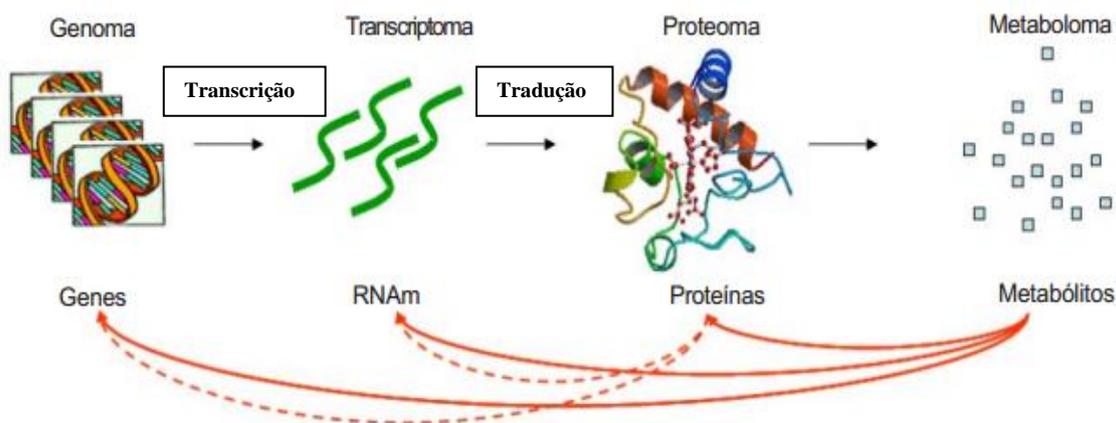
exaustiva exploração das bases fisiológicas e bioquímicas (FLEET, 2008; BELDA *et al.*, 2014).

Binneck (2004) relata que existe um crescente reconhecimento e entendimento de que metodologias baseadas na sequência de DNA terão que ser complementadas pela análise direta dos produtos codificados pelos genes; os RNAs e as proteínas. Sabe-se que conhecer a sequência de um genoma não garante que as proteínas codificadas por esse genoma possam ser imediatamente determinadas (por exemplo, por homologia com proteínas, já conhecidas de outros organismos).

Há uma estimativa baseada nos genomas completos que cerca de 30% do conteúdo gênico de um organismo seja de proteínas específicas deste. É claro que esse número tende a diminuir à medida que mais e mais genomas vão sendo sequenciados, mas mostra a dificuldade em proceder-se a uma anotação automatizada (confiável e completa) dos genomas. A utilização integrada dessas ferramentas possibilitará o entendimento de como os produtos desses genes atuam conjuntamente para regular as atividades do organismo (RUBIN *et al.*, 2000; BINNECK, 2004).

Está exemplificada na Figura 2 a interação existente entre as omicas, observando sua ação em conjunto, uma dependendo da outra, sendo que sua atuação será obtida no produto final, neste caso, o vinho.

Figura 2 - O funcionamento celular em nível molecular



Fonte: adaptado de Villas-Bôas (2006)

A informação codificada no DNA é transcrita em uma molécula de RNA mensageiro que é traduzida em uma molécula de proteína que, quando não exercendo um papel estrutural, irá catalisar uma ou mais reações químicas dentro e/ou fora da célula, sendo, portanto

responsável pela transformação de pequenas moléculas químicas chamadas de metabólitos. Os metabólitos, por sua vez, regulam a atividade das proteínas e o processo de transcrição e tradução, além de servirem de substratos para modificação e síntese das proteínas e lipídeos e a síntese de DNA e RNA. Portanto os metabólitos são os produtos finais do metabolismo celular (VILLAS-BÔAS *et al.*, 2006).

2.5 Genômica aplicada à *S. cerevisiae* e vinho

A genômica se caracteriza pelo estudo dos genes e suas funções. A sua chegada, com o projeto genoma humano no final da década de 1980, alavancou toda a revolução atual no campo da biologia. Muitas expectativas e investimentos têm sido empregadas na genômica, visando aplicações nas áreas da indústria farmacêutica, agricultura, produção de energia, proteção do meio ambiente e melhoramento dos produtos alimentícios. Mas a determinação da sequência completa de vários genomas não é o final da história. É apenas o começo, principalmente pelo fato de que mecanismos biológicos não podem ser inferidos simplesmente a partir do conhecimento da sequência sem o auxílio de outras estratégias de estudo, ou seja, das ômicas em geral.

A engenharia genética tornou-se uma possibilidade confiável para o melhoramento das leveduras. Esta técnica permite modificar um micro-organismo para que suas propriedades sejam otimizadas ou que seus defeitos sejam eliminados (PRETORIUS, 2000; GIUDICI *et al.*, 2005; BELDA *et al.*, 2014). Todavia, as técnicas de modificações genéticas exigem certificação, principalmente na indústria alimentar. Contudo, além do controle de extrema necessidade para produzir alimentos com Organismos Geneticamente Modificados (OGM) há uma tendência na utilização de micro-organismos naturais, com ênfase na elaboração de vinhos (SCHULLER & CASAL, 2005; BELDA *et al.*, 2014).

A sequência completa do genoma de *S. cerevisiae* é conhecida: Tem um genoma relativamente pequeno e compacto (12.100.000 pb) (cerca de 13.000 Kb), um grande número de cromossomos (16 cromossomos que variam em comprimento entre 200 a 2200 kb), um reduzido número de genes (cerca de 6000 genes codificadores de proteínas), pouco DNA repetitivo e poucos íntrons (PRETORIUS, 2003).

Pretorius (2003) afirma que a seleção clássica das cepas e os métodos de modificação, tais como a seleção de variantes, a mutagênese, a hibridação (cruzamento, cruzamento esporo-célula, citodução e fusão de esferoplastos), são baseados principalmente numa aproximação pouco específica. Com esta aproximação, grandes regiões genômicas ou

genomas completos são recombinados e reestruturados. Contudo, estes métodos não são suficientemente específicos para alterar as leveduras enológicas de uma forma bem controlada e podem provocar o desenvolvimento de algumas propriedades das estirpes, comprometendo, no entanto, outras características desejáveis.

Schuler & Casal (2006) apontam que a seleção clonal de cepas de *Saccharomyces* isoladas a partir do meio natural em zonas vitícolas de reconhecido interesse é sempre o ponto de partida de qualquer programa de seleção de leveduras naturais. As modificações introduzidas num processo de transformação genética de uma levedura não devem modificar as características essenciais da atividade microbiana no processo de fermentação.

Vale ressaltar que dentro de um processo de evolução genética natural, leveduras são capazes de se adaptar aos mais diferentes ambientes em função da evolução natural, no entanto, estudos moleculares mostraram que mutações adaptativas incluindo a geração de novos alelos de nucleotídeos podem ser formadas (CUBILLOSET *et al.*, 2011; SALINAS *et al.*, 2012).

Dentro do estudo do genoma, existe a genômica comparativa. Esse ramo vem se tornando cada vez mais comum dada a quantidade de sequências de genomas sendo produzidas, tem o objetivo de comparar todo o conteúdo de DNA do genoma de um organismo particular com outros genomas já conhecidos. Através dessa análise pode ser possível identificar diferenças, tanto no conteúdo gênico quanto não gênico, que podem ser responsáveis por importantes propriedades fenotípicas ou evolutivas, como patogenicidade, reações a condições ambientais adversas, proximidade taxonômica entre grupos e até mesmo a aquisição (ou manifestação) de determinados comportamentos individuais (BINNECK, 2004).

Em distintas regiões do mundo, diversos pesquisadores buscam caracterizar genomicamente as leveduras, no intuito de identificar específicas características enológicas em cepas de *Sc* que possam ser diferenciais, agregando valor ao produto (*terroir*, denominação de origem). TOFALO *et al.* (2014), trabalhando com cepas de *Sc* na Itália, demonstrou uma pequena mutação num gene da levedura, determinada por pressão de seleção específicas de um vinhedo, que pode determinar o desempenho da levedura e o curso da fermentação alcoólica, sem afetar o crescimento celular.

Como exemplos de estudos genômicos aplicados à enologia podem ser citados os trabalhos de ZHANG *et al.* (2015) que, na Nova Zelândia, caracterizaram *S. uvarum* de mostos e que apresentaram genes tolerantes ao sulfito. Ibañez *et al.* (2014) analisando 6 diferentes *S. cerevisiae*, encontrou diferenças entre todas as cepas estudadas, relacionando

famílias de genes que, embora não essenciais à vida da levedura, podem determinar importante papel na adaptação a distintas condições ambientais, como por exemplo, tolerância ao etanol. DI TORO *et al.* (2015), demonstraram variabilidade genética em *Brettanomyces bruxellensis* e atribuíram a biodiversidade a ambientes vinícolas regionais, indicando que cada região tem sua microbiota específica, seja positiva ou negativa ao vinho.

Jennifer *et al.* (2013) gerou um híbrido a partir do cruzamento entre uma levedura *S. cerevisiae* e *S. mikatae* (ideal para a elaboração de vinhos e outra não utilizada, respectivamente). Esta hibridação favoreceu o pleno consumo dos açúcares (*S. cerevisiae*) e contribuiu para as características sensoriais gerais do vinho (*S. mikatae*), denotando compostos associados às espécies não-*Saccharomyces*. Este híbrido de *S. cerevisiae* e *S. mikatae* têm o potencial para produzir vinhos complexos, semelhantes aos de fermentação espontânea, proporcionando a salvaguarda de uma levedura comercial.

Harsch *et al.* (2013) aplicou uma pesquisa no qual selecionou 67 genes responsáveis pela liberação de tióis voláteis em vinho Sauvignon Blanc. O trabalho aborda que a deleção de 17 destes genes afeta na liberação de compostos aromáticos (frutas tropicais), podendo reduzir ou aumentar a produção em até duas vezes. Os genes deletados estavam envolvidos no metabolismo de nitrogênio e enxofre pelas leveduras.

A produção de sulfeto de hidrogênio por leveduras é um problema frequente durante a elaboração de vinhos, produzindo odor característico a ovos podres. Portanto, é importante selecionar linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que não liberem sulfeto de hidrogênio durante a fermentação. Wlodarczyk *et al.* (2012) avaliou 120 linhagens de leveduras isoladas das cultivares Cabernet Franc, Tannat e Ancellotta do município de Pinto Bandeira (RS) e sua relação à formação de sulfeto de hidrogênio e capacidade de fermentação. Todas as linhagens com alta taxa de fermentação não produziram sulfeto de hidrogênio, representando 13,3%. Apenas uma destas formou sulfeto de hidrogênio em pequena quantidade. Alta produção de sulfeto de hidrogênio foi encontrada em 35,8% das linhagens isoladas, sendo estas também caracterizadas por baixa capacidade fermentativa. Somente 16 linhagens mostraram potencial para elaborar vinhos sem aromas desagradáveis provocados pelo H₂S.

2.5.1 Polymerase chain reaction (PCR)

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (tradução literal) consiste em amplificar determinada sequência de genes através da utilização da enzima polimerase e primers (sequência de pb) específicos, onde através de vários ciclos de temperatura se obterá

o produto da PCR. González *et al.* (2006) e Belda *et al.* (2014) descrevem que a partir da técnica de PCR e em função dos tamanhos obtidos referentes aos pares de base (pb) restritos por enzimas específicas, é possível identificar a nível de espécie um grande número de leveduras distintas.

2.6 Transcriptômica aplicada à *S. cerevisiae* e vinho

O produto inicial da expressão gênica em um organismo é conhecido como transcriptoma e se caracteriza por uma coleção de moléculas de RNA mensageiro cuja informação biológica é requerida pela célula em um determinado momento. Essas moléculas de mRNA são sintetizadas a partir de genes que codificam proteínas e, assim, direcionam a síntese do produto final da expressão gênica, o proteoma, que especifica a natureza das reações bioquímicas que a célula está apta a realizar. Um ponto importante a notar é que o transcriptoma nunca é sintetizado de novo, isto é, não começa do zero. Cada célula recebe parte de seu transcriptoma materno quando é formada pela divisão celular, e depois é responsável pela manutenção e adaptação do transcriptoma conforme os diferentes estágios de sua vida e o tipo de diferenciação tomado (BINNECK, 2004).

Binneck (2004) descreve que os avanços tecnológicos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), no intenso sequenciamento de DNA e na síntese de novos ácidos nucleicos, têm contribuído para o desenvolvimento de técnicas de quantificação de mRNA em larga escala, em muitos casos em escala genômica, possibilitando que centenas ou milhares de genes sejam estudados em paralelo em vez de um gene de cada vez.

A abundância do mRNA nem sempre é bem correlacionada com a abundância da proteína, a atividade das proteínas codificadas pelos mRNAs é regulada a vários níveis após a sua expressão, por exemplo, a localização subcelular e/ou a extensão em que as proteínas são pós-traducionalmente modificadas, não são reveladas pela medição da abundância do mRNA (BINNECK, 2004).

Um exemplo significativo e de fácil entendimento é a prática de chaptalizar o mosto/vinho, pois a levedura *Saccharomyces* tem desenvolvido vários mecanismos de detecção e sinalização celular para garantir não só a absorção eficiente de açúcar, mas também para diminuir a utilização de fontes de energia para a metabolização destes açúcares, favorecendo a produção de etanol (ROLLAND *et al.*, 2002; FRICK *et al.*, 2005). *S. cerevisiae* produz uma enzima (β -D-frutose 1,6-bisfosfatase), capaz de hidrolisar a sacarose em glicose e frutose. Esta enzima tem sido um paradigma para o estudo da síntese de proteínas e regulação da

expressão do gene, pois a invertase é codificada por um ou vários genes SUC (SUC1 para SUC5 e SUC7), SUC2 sendo o locus mais comum encontrado em quase todas as estirpes de *S. cerevisiae*, inclusive em outras espécies de leveduras intimamente relacionadas, tal como *S. bayanus* (NAUMOV *et al.*, 1996; KORSHUNOVA *et al.*, 2005). Estes genes SUC geraram dois mRNAs diferentes, um de maior e outro de menor expressão, onde o transcrito mais curto ainda não foi sequenciado, pois é reprimido por concentrações elevadas de sacarose ou seus produtos de hidrólise (glicose e frutose). Desta forma quando açúcares são adicionados no mosto/vinho que possuem baixo teor de açúcares naturais da uva, torna-se mais efetiva a metabolização do mesmo (BADOTTI *et al.*, 2008). Tais fenômenos demonstram que o processo genético celular em leveduras pode ser regulado pelos teores de açúcares, influenciando significativamente os teores de RNA transcrito e traduzido, impactando nos efeitos nos ambientes onde a levedura está inserida.

A produção de ácido acético durante a fermentação do vinho é uma questão crítica para vinícolas uma vez que a qualidade sensorial do vinho pode ser afetada pela quantidade de ácido acético que contém. Walkey *et al.* (2012) descobriu que uma sequência específica de RNAm codifica uma enzima que propicia a produção de ácido acético. Para a comprovação deste resultado o gene foi deletado, fazendo com que a levedura produzisse menores quantidades de ácido acético.

2.7 Proteômica aplicada à *S. cerevisiae* e vinho

Para entender a função de todos os genes de um organismo, é necessário conhecer não só quais genes são expressos, quando e onde, mas também quais são os produtos da expressão e em que condições esses produtos (proteínas) são sintetizados. A proteômica tenta descrever o conjunto completo de proteínas produto da expressão do genoma e fornece informações importantes para complementar os estudos de transcriptômica e metabolômica (JAMES, 1997; BINNECK, 2004).

Muitas proteínas importantes na biologia humana foram descobertas em estudos homólogos em leveduras, onde incluem proteínas do ciclo celular, e processos enzimáticos. O estudo deste cenário torna-se um fator bastante importante, pois de uma maneira geral será possível interligar as mudanças fisiológicas observadas nas leveduras, quando induzidas com os erros de descodificação do mRNA, com o metabolismo das células (SANTOS, 2009).

Estudos proteômicos podem ajudar a relacionar o genoma e o proteoma de determinadas funções celulares, pois são complementares a estudos direcionados a genômica

e a transcriptômica, uma vez que a totalidade de RNAm não é perfeitamente correlacionada com a expressão do gene (GIGY *et al.*, 1999), ou seja, nem todo RNA tem função definida na atividade celular. Trabalzini *et al.* (2003) relata que estudos que abordem o proteoma das leveduras destinadas a elaboração de vinhos ainda são desconhecidos, no entanto há demanda por conhecimentos correlacionados para otimizar os processos industriais através da aplicação de biotecnologias. Esta mesma pesquisa constata que a resposta proteômica relacionada a estresses ambientais envolve tanto a indução, quanto a repressão de proteínas específicas, contudo a maior parte das proteínas que constituem a célula é produzida na fase exponencial (log).

Não somente o estresse causado pelo teor alcoólico pode afetar a expressão de proteínas, mas também a interferência do vacúolo celular de *Saccharomyces cerevisiae*, pois possui o poder de degradar algumas proteínas. Outro aspecto que interfere na mudança proteômica das leveduras é a ausência de glicose, conforme demonstrado por Trabalzini *et al.* (2003), que testaram a adição de proteassoma, que apresenta-se como um complexo de proteínas que tem por finalidade degradar outras proteínas diminuindo seu tamanho molecular, assim a sua ação foi mais eficaz nas primeiras horas de reprodução celular, sendo concomitante com a quantidade disponível de glicose ao meio.

A proteômica depende da extração, separação, visualização, identificação e quantificação das proteínas presentes em um organismo ou tecido, em um determinado momento. Todos esses estágios têm limitações (BINNECK, 2004).

Como exemplos de estudos proteômicos, destaca-se os de Moreno-García *et al.* (2014), que, ao analisar proteínas mitocondriais de diferentes cepas de *S. cerevisiae*, verificou que não só as proteínas, como também metabólitos originados na mitocôndria estavam relacionados com tolerância ao etanol, respiração celular, manutenção do genoma mitocondrial e apoptose, condições intimamente relacionadas à fermentação alcoólica e elaboração de vinhos.

Destacam-se também os estudos envolvidos com o fator *killer*, fator este mediado por proteínas (especialmente de *Sc*) e extremamente importante no declínio da microbiota autóctone no início da fermentação. Mostert & Divol (2014), observaram que “proteínas killer” produzidas por *Sc* em vinho tem um espectro de ação contra outras leveduras *Sc* e também espécies de *Candida*. Esta especificidade tem relação com o conjunto proteico presente nas cepas sensíveis, uma vez que os receptores do fator *killer* foram manoproteínas e glucanas presentes na parede celular destas cepas.

2.8 Metabolômica aplicada à *S. cerevisiae* e vinho

A função de um gene é determinada quando se identificam todos os seus respectivos produtos genéticos, ou seja, mRNA, proteínas e metabólitos (NIELSEN *et al.* 2005; SANTOS, 2009). Com esta necessidade, surge uma nova etapa e um novo estudo, o metaboloma (o mais recente dos omas), sendo este o estudo do conjunto de todos os metabólitos (pequenas moléculas, como hormônios, metabólitos secundários, etc.), que podem ser encontrados numa célula/organismo (ERIKSSON *et al.* 2004; SANTOS, 2009). A metabolômica tem como objetivo compreender os organismos vivos de forma integrada e coerente, em vez de olhar para organismos isolados, dissecados em partes moleculares (LINDON *et al.*, 2007; SANTOS, 2009). A metabolômica fundamenta-se muito bem relacionando na globalidade todos os outros estudos, “omics”, desde os genes às proteínas, e não se restringe somente a uma componente (SANTOS, 2009).

Para o metabolismo, mais precisamente nas reações metabólicas, as enzimas são vitais porque permitem a realização de reações desejáveis controlando os processos adjacentes, como também regulam as vias metabólicas em resposta a mudanças no ambiente celular ou a sinais de outras células. Cada enzima pode sofrer regulação da sua atividade, aumentando-a, diminuindo-a ou mesmo interrompendo-a, de modo a modular o fluxo da via metabólica em que se insere. Ocorrendo uma alteração numa das vias metabólicas todas as outras vias ficam alteradas resultando assim num stress à célula ou organismo (CAMPBELL 1999; SANTOS, 2009).

Num estudo metabolômico, as técnicas mais usadas para análise das amostras são duas: a ressonância magnética nuclear (NMR) e a espectrometria de massa (MS). Estas duas técnicas são as mais usadas na detecção e análise de metabólitos celulares, embora diferentes, por vezes complementam-se. Espectrometria de massa: Esta técnica combina a possibilidade de detectar pequenas quantidades de compostos conhecidos em amostras biológicas complexas. Além disso, a combinação da espectrometria de massa com outras técnicas de separação (cromatografia e electroforese) tornou esta técnica uma “arma” poderosa na identificação e análise química de amostras biológicas complexas (SANTOS, 2009). Ressonância magnética: fundamentam-se no facto de esta técnica representar uma ferramenta poderosa devido à informação estrutural que nos fornece acerca da presença de pequenas moléculas orgânicas, e ainda a existência de um grande número de metabólitos catalogado em base de dados. A ressonância magnética nuclear quando comparada com a espectrometria de

massa apresenta-se como uma técnica não invasiva permitindo guardar as amostras para estudos futuros (DUMAS *et al.* 2006; SANTOS, 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Elaboração do vinho

O trabalho foi realizado na Vinícola Experimental e no laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Pampa – Campus Dom Pedrito. O vinho foi elaborado a partir do mosto extraído de uvas Isabel, Jacquez e Moscato Embrapa, oriundas da Serra Gaúcha, inicialmente para a elaboração de suco utilizando panelas extratoras a vapor, pois no período em que a pesquisa foi aplicada era a entressafra, impossibilitando o uso de uvas frescas, totalizando assim 15 litros de mosto. A elaboração de suco por este método apresenta peculiaridades, tendo em vista que o vapor pode interferir no produto fazendo parte de sua constituição além de pasteurizar o mosto, evitando contaminações indesejadas e a não adição de conservantes.

A vinificação ocorreu de maneira convencional aplicada à vinhos brancos, ressaltando que o corte entre as três cultivares originou um vinho de coloração rosé. A primeira etapa da vinificação constituiu-se em homogeneizar os sucos e deixá-los em repouso por 4 horas, fazendo com que as borras em suspensão precipitassem, melhorando o aspecto visual do mosto, além de evitar que aromas herbáceos fossem agregados ao vinho.

No momento da homogeneização foi adicionado metabissulfito de potássio na dosagem de 50 mg.L^{-1} , para evitar oxidações. Após, adicionou-se 3 g.HL^{-1} de enzima pectolítica, respeitando um intervalo mínimo de 30 minutos para que o SO_2 não afetasse na ação da enzima e vice-versa. Esta enzima propicia a quebra da pectina, desta maneira liberando constituintes de coloração, aromas e estrutura ao vinho.

Dada a baixa concentração de açúcares (média de $13,48 \text{ }^\circ\text{Babo}$) realizou-se a chaptalização⁵ do mosto adicionando para evitar um vinho com graduação alcoólica sensorialmente desagradável ($7,82\% \text{ v/v}$). Ao total, foram adicionados 787,5 g de sacarose, para o aumento de 3°GL , de acordo com a legislação vigente (Decreto nº 8.198 de 2014) para chaptalizar vinhos comuns.

⁵ Chaptalizar o mosto é a prática de adicionar açúcares, com objetivo de corrigi-lo para que a graduação alcoólica aumente (Lei do Vinho nº 9.610/98).

Após a chaptalização, se reidratou e multiplicou no pé de cuba⁶ a levedura comercial *S. bayanus* (Maurivin PDM[®]), logo inoculando-a no mosto para que a fermentação alcoólica iniciasse. A quantidade de levedura comercial utilizada foi de 40 g.HL⁻¹, sendo a dosagem máxima recomendada pelo fabricante, onde 6 gramas de levedura seca ativa foram necessárias para fermentar os 15 litros de mosto. A re-hidratação e a multiplicação ocorreram com a adição de 60 mL de água a 36°C, sendo dobrado o volume do pé-de-cuba com o mosto, até que este representasse 10% do volume total de mosto a ser fermentado, logo sendo adicionado em um garrafão de vidro de 20 litros de capacidade (Figura 3), tampado com Válvula de Müller. A fermentação alcoólica ocorreu em sala climatizada, mantendo a temperatura a 16°C.

Figura 3 – Mosto em fermentação alocado em garrafão de 20 litros de capacidade



Fonte: Autor, 2014

Após 24 horas separou-se o mosto em fermentação em 3 repetições, já encontrando-se em fermentação acentuada (Figura 4), com a finalidade de evitar paradas de fermentação.

⁶ Pé-de-cuba refere-se a reidratação e multiplicação das leveduras para que o começo da fermentação alcoólica tenha início o mais rápido possível.

Figura 4 - Mosto em fermentação alcoólica



Fonte: Autor, 2014

Cada repetição foi representada por um garrafão de vidro de 5 litros de capacidade (Figura 5).

Figura 5 - Repetições experimentais em garrafões de 5 litros de capacidade



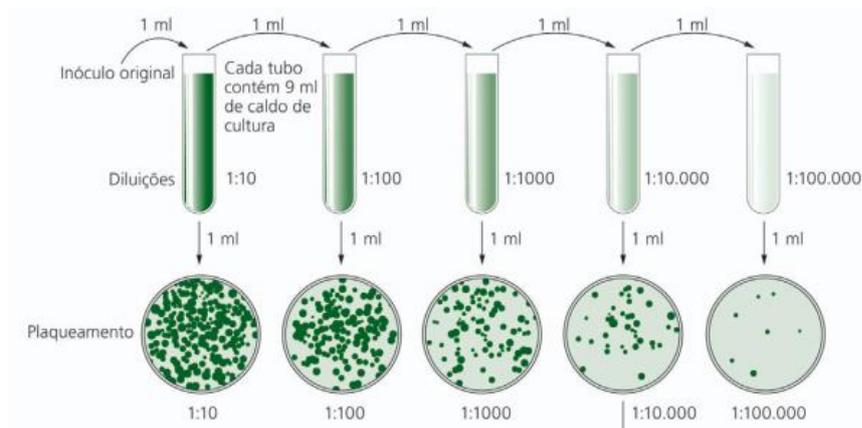
Fonte: Autor, 2014

A fermentação alcoólica ocorreu em 10 dias, sendo acompanhada pela densidade do líquido, teor de sólidos solúveis totais (°Brix) e teor de açúcares (°Babo). Utilizando densímetro, refratômetro digital e balança hidrostática eletrônica.

3.2 Curva de crescimento das leveduras em fermentação alcoólica

A concentração celular durante o período de fermentação alcoólica foi realizada técnica de Spread-Plate⁷, utilizando o meio de cultura *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YEPD - 5% glicose; 5% peptona; 2,5% extrato de levedura; 5% ágar), fornecendo os nutrientes necessários para o crescimento de leveduras. Amostras de mosto foram coletadas com intervalos de 24 horas. Diluições decimais seriadas foram realizadas até 10^{-5} (até o 4º dia de fermentação) e 10^{-6} (até o final da fermentação), durante os 10 dias de fermentação, sendo 1 mL de cada diluição semeada em superfície (*spread plate*). Na sequência, as placas de petri foram incubadas em estufa à 28°C para o crescimento das colônias durante 48 horas.

Figura 6 - Exemplificação sobre o método de diluição de amostras



Fonte: CARVALHO, 2010

3.3 Amostras para a extração de DNA

Durante a fermentação alcoólica foram armazenadas amostras do mosto/vinho para que o DNA das leveduras presentes pudesse ser extraído. Retirou-se 50 mL de mosto/vinho em cada uma das repetições 3 vezes ao dia, no intervalo de 10, 6 e 8 horas até o final da fermentação alcoólica. As amostras foram codificadas e armazenadas, congelando-as em tubos Falcon de 50 mL de capacidade e devidamente esterilizados. No momento de sua utilização para a extração do DNA as amostras eram separadas em microtubos de 2 mL de capacidade.

⁷ Na técnica “*Spread-Plate*” o meio de cultura já se encontra na placa e os microrganismos são colocados por cima do meio e são espalhados com o auxílio da Alça de Drigalsky (VIEIRA, 2008).

3.3.1 Protocolo de extração de DNA a partir do vinho

O protocolo de extração de DNA foi adaptado do método descrito por Anchorena-Matienzo (2002). 2 mL da amostra de mosto/vinho foi alocado em microtubos com capacidade de 2 mL. Centrifugou-se à 15.000 rpm (rotações por minuto), durante 20 minutos à 4°C. Após, descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 1 mL de tampão de extração (Tris HCl 1 M, NaCl 5M, EDTA 0,5 M, SDS 10% e Água ultra pura; pH da solução - 8,0) seguida de nova centrifugação (10.000 rpm; 10 minutos; 4°C). A seguir, eliminou-se o sobrenadante.

Na sequencia foi adicionado 200 µL de tampão de extração, 200 µL de pérola de vidro (0,5 mm de diâmetro) e 300 µL de solução Fenol, Clorofórmio e Álcool Isoamílico (25:24:1), levando os tubos para o vortex por 40 segundos. Após, centrifugou-se novamente (13.000 rpm; 10 minutos; 4°C). A fase superior obtida foi repassada para outro microtubo, adicionando em seguida 1 mL de álcool absoluto gelado, além de 100 µL de NaCl 3 M, deixando repousar por 1 hora no congelador (-20°C).

Após, centrifugou-se a amostra (13.000 rpm, 8 minutos; 4°C) e descartou-se o sobrenadante. O pellet foi seco em temperatura ambiente, em fluxo laminar. Ressuspendeu-se o pellet em 40 µL de tampão TE, além de 1 µL de RNase. O DNA obtido foi visualizado sob luz ultra violeta após eletroforese em gel de agarose 1% adicionado de brometo de etídio em comparação com o marcador de massa molecular de Ladder 1 KB (Ludwig Biotec).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento das leveduras durante a fermentação alcoólica

Para estimar o teor alcoólico do vinho, multiplicou-se o °Babo existente no mosto (referente ao teor de açúcares) pelo fator 0,58, conforme descrito por (GIOVANINNI, 2003). As características do mosto antes da chaptalização estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1- Características iniciais do mosto antes da chaptalização.

Item	R1	R2	R3
Sólidos Solúveis Totais (°Brix)	15,94	15,88	15,8
°Babo	13,54	13,49	13,42
Densidade (20°C)	1.065	1064	1064
pH	3,18	3,34	3,21
Acidez Total (meq.L⁻¹)	74,8	72,8	73,4
Álcool provável (°Babo x 0,58)	7,85	7,82	7,78

Fonte: Autor, 2014

Após a adição de açúcares, obteve-se um mosto com melhores características, com a finalidade de promover uma fermentação adequada, no qual o percentual alcoólico provável médio foi de 10 % v/v. O aporte de açúcar originou maiores concentrações de carboidratos, desta maneira aumentando o teor alcoólico devido à síntese metabólica das leveduras. Na Tabela 2 é possível observar o número de colônias contabilizadas no decorrer da fermentação alcoólica (FA).

A Tabela 2 está dividida em blocos relacionados aos dias de fermentação (10 dias) e as repetições utilizadas (R1, R2 e R3). Para que a curva de crescimento fosse obtida, selecionaram-se as repetições que apresentaram padrões de crescimento mais próximos aos citados por Carvalho (2010), onde se preconiza placas com crescimento superior a 50 colônias e inferior a 250 colônias, logo multiplicado pelo valor de diluição para que seja estimada a quantidade de células existentes. Em vermelho, estão os resultados utilizados para o desenvolvimento da curva de crescimento, onde o valor aproximado foi melhor retratado.

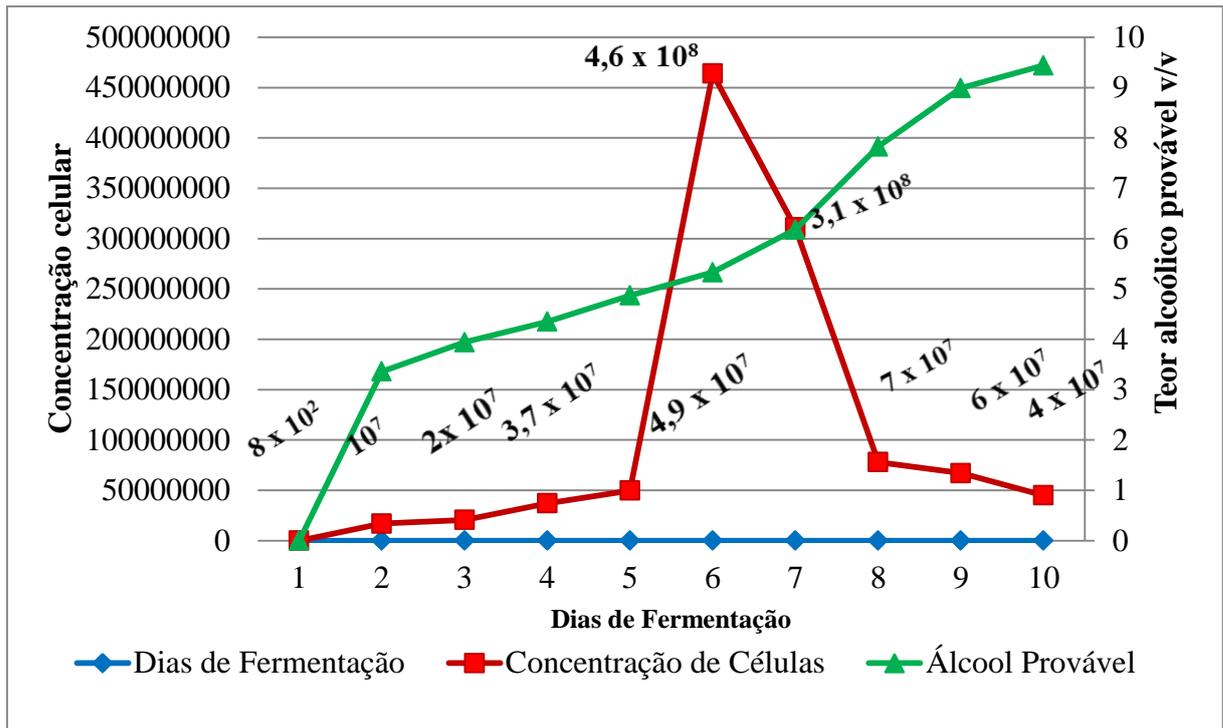
Tabela 2 – Número de colônias contabilizadas ao longo da fermentação alcoólica.

Dias de FA e Repetições (R)	Diluições						
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Dia 1 - R1	85	6	1	0	0	0	-
Dia 1 - R2	81	6	1	0	0	0	-
Dia 1 - R3	83	6	2	0	0	0	-
Dia 2 - R1	>	>	>	>	501	92	-
Dia 2 - R2	>	>	>	>	254	82	-
Dia 2 - R3	>	>	>	>	428	169	-
Dia 3 - R1	>	>	>	>	628	272	-
Dia 3 - R2	>	>	>	>	742	205	-
Dia 3 - R3	>	>	>	>	553	177	-
Dia 4 - R1	>	>	>	>	2084	649	-
Dia 4 - R2	>	>	>	>	>	370	-
Dia 4 - R3	>	>	>	>	>	931	-
Dia 5 - R1	>	>	>	>	>	616	-
Dia 5 - R2	>	>	>	>	>	497	-
Dia 5 - R3	>	>	>	>	>	569	-
Dia 6 - R1	>	>	>	>	>	1705	655
Dia 6 - R2	>	>	>	>	>	>	464
Dia 6 - R3	>	>	>	>	>	1011	>
Dia 7 - R1	>	>	>	>	>	>	397
Dia 7 - R2	>	>	>	>	>	>	311
Dia 7 - R3	>	>	>	>	>	>	660
Dia 8 - R1	>	>	>	>	>	>	408
Dia 8 - R2	>	>	>	>	>	>	78
Dia 8 - R3	>	>	>	>	>	60	26
Dia 9 - R1	>	>	>	>	>	>	>
Dia 9 - R2	>	>	>	>	>	>	>
Dia 9 - R3	>	>	>	>	>	>	67
Dia 10 - R1	>	>	>	>	>	>	177
Dia 10 - R2	>	>	>	>	>	>	45
Dia 10 - R3	>	>	>	>	>	>	225

(>) Referente ao elevado crescimento de colônias, impossibilitando a contagem. (-) Não houve semeadura.
FA: fermentação alcoólica. Fonte: Autor, 2014

Os resultados inerentes a curva de crescimento podem ser observados no Gráfico 1. É possível visualizar a curva de crescimento de leveduras durante fermentação alcoólica e teores de álcool provável nos distintos dias de fermentação.

Gráfico 1 - Desenvolvimentos das leveduras durante fermentação alcoólica associada a produção de álcool estimado.



Fonte: Autor, 2014

Observando a curva de crescimento de leveduras durante a fermentação (10 dias) evidencia-se uma semelhança à curva de crescimento descrita por SANTOS (2009), com uma fase de adaptação (fase lag) até aproximadamente o 5º dia do processo, um crescimento exponencial (fase log) do 5º para o 6º dia e uma fase de declínio entre o 7º e 10º dia. Como a atividade das leveduras é extremamente dinâmica, é possível supor que, com determinações em intervalos mais reduzidos (6 ou 12 horas) a curva ficaria ainda melhor determinada. Analisando o percentual de álcool provável é possível observar que as concentrações foram sempre crescentes, com o ápice (9% v/v aproximadamente) no 10º dia de fermentação. O acompanhamento do desenvolvimento das leveduras é importante para prever comportamentos celulares atípicos, particularmente com o risco da paralisação da fermentação.

4.1.1 Fase de latência (LAG)

É caracterizada pela adaptação da célula do micro-organismo ao novo meio, quer seja através da inoculação ou contaminação. Esta fase é influenciada pela idade da cultura, quantidade de células inoculadas, tipo de micro-organismo, características do alimento e meio ambiente (pH, oxigênio, composição do meio, substâncias inibidoras, etc.) (CARVALHO, 2010).

Se desejarmos elaborar alimentos, e também vinhos, a partir de micro-organismos, devemos então oferecer as condições ideais para que estes passem o menor tempo possível na fase de latência (lag), entrando imediatamente na fase logarítmica (log). Ao contrário, se desejarmos conservar o alimento, devemos evitar a multiplicação, dando condições desfavoráveis à multiplicação (CARVALHO, 2010). Este fato pode ser exemplificado pela adição de SO₂ após a fermentação alcoólica, evitando que bactérias ácido-láticas se reproduzam.

Após o inóculo das leveduras percebeu-se uma acentuada liberação de gás carbônico, indicando que a fermentação já estava iniciada. Vázquez-Lima *et al.* (2014), aborda que a liberação de CO₂ é acentuada desde a fase inicial até a exponencial, porém há o declínio na fase estacionária. Este período coincide com uma redução substancial do teor de azoto do meio. Ao final da fase exponencial ocorre um ápice na produção de CO₂, logo começando a diminuir gradativamente. Em relação à pesquisa, foi observado que a liberação de CO₂ começou a decair ao final do 5º dia.

Muller *et al.* (2007) pesquisou sobre a curva de crescimento de *Saccharomyces*, relatando que o crescimento celular foi nulo devido à adaptação das células na fase lag, havendo um aumento gradual do crescimento, sendo que nesta fase toda a população começa a se dividir em um intervalo regular médio de tempo. Correlacionando informações, o crescimento foi também é considerado gradativo.

Fator importante para o sucesso da fermentação alcoólica é o controle de oxigênio presente no meio, geralmente sendo mais bem controlado quando se elabora vinhos brancos, mais sensíveis a oxidações. Para que o tempo da fase lag seja diminuído, aportar oxigênio é uma opção benéfica. Exemplo disto é relatado no trabalho de Portell *et al.* (2010), onde se testou o crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* até o momento em que a curva de crescimento tornou-se estável (fase estacionária), fazendo comparações a presença de oxigênio e a sua ausência (micro fermentações ocorridas à 27°C). Como resultados aponta-se que em meio anaeróbio a fase estacionária teve início após 40-50 horas após o início da

fermentação, já as amostras que estiveram em contato com o oxigênio a fase estacionária começou em aproximadamente 20-30 horas, sendo que o efeito do oxigênio aumentou em 30% o número de células de leveduras. Considera-se então que o oxigênio maximiza o processo de fermentação, fato este amplamente conhecido. Contudo, o oxigênio favorece que mais células sejam desenvolvidas, culminando em maiores quantidades de manoproteínas e polissacarídeos liberados ao vinho, podendo favorecer práticas enológicas, tais como a *Battônage*⁸.

Embora a fase de latência seja relatada como um período de adaptação dos microorganismos, em relação ao vinho, as leveduras conseguem ser efetivas de forma que a metabolização dos açúcares do mosto é bastante eficaz. Neste estudo a liberação de etanol, da mesma forma que gás carbônico, foi considerável, indicando que a fermentação alcoólica ocorria dentro do esperado.

A fase lag foi retratada por uma excelente concentração celular, porém o crescimento exponencial foi retardado por diversos fatores, tais como baixa temperatura de fermentação (16°C) e a ausência de nitrogênio prontamente assimilável, pois não houve a inserção de insumos que propiciassem este substrato. Uma prática que poderia ter otimizado o começo da fase log, seria a inserção de oxigênio ao meio, através trasfegas em ciclo aberto, entretanto na elaboração de vinhos brancos e rosés, há possibilidades de oxidações.

4.1.2 Fase logarítmica (LOG)

Quando os microrganismos encontram as condições ideais para a sua multiplicação, dá-se o fim da fase de latência (lag) e inicia-se a fase logarítmica (log), também conhecida como fase exponencial, por se tratar de um crescimento em progressão geométrica. Uma célula se divide e dá origem a outra e assim sucessivamente (CARVALHO, 2010).

Esta fase é caracterizada pelo crescimento acelerado e a predominância de células jovens que apresentam seu máximo potencial metabólico. Com o aumento populacional há esgotamento de nutrientes e/ou alta concentração de metabólitos tóxicos que limitará a multiplicação, pondo fim a fase de crescimento exponencial, ou seja, a fase logarítmica (CARVALHO, 2010).

⁸ Gabbardo (2009) descreve que para favorecer a autólise usa-se a técnica de “*bâttonage*”, que nada mais é do que agitar os sedimentos contidos nos vinhos (restos celulares das leveduras) através de uma remontagem em ciclo fechado.

No gráfico está exemplificado que a fase logarítmica coincide com a fase estacionária, ocorrendo entre o 5º e o 6º dia. Muller *et al.* (2007) observou como resultado uma inclinação acentuada da curva de crescimento, atribuída a fatores e condições favoráveis ao metabolismo, onde a formação de unidades funcionais celulares é máxima. O consumo de substrato também é máximo nesta fase, pois visa suprir as necessidades celulares na fermentação alcoólica onde uma molécula de glicose é convertida em duas moléculas de ATP's gerando energia para a célula fase exponencial.

A primeira e a segunda fase de fermentação (lag e log, respectivamente) talvez sejam as mais determinantes no sucesso de uma vinificação. Nestas fases há uma grande exigência por fatores de sobrevivência (oxigênio, aminoácidos, etc.). Segundo Vázquez-Lima *et al.* (2014) a concentração de compostos nitrogenados começa a diminuir após 60 horas do início da fermentação e irá diminuindo conforme o teor alcoólico vá aumentando. Portanto, fazer um aporte de aminoácidos a partir da metade da fermentação alcoólica irá assegurar o consumo eficaz da mesma.

Na produção de vinho espumante pelo método tradicional, após a segunda fermentação ocorre a autólise das leveduras. Para que a segunda fermentação ocorra é comum que se faça o pé-de-cuba. Raga *et al.* (2014) em seu trabalho fez comparativos entre a utilização de nitrogênio exógeno e o natural proveniente dos resíduos celulares das leveduras da primeira fermentação. Os resultados apontaram que o nitrogênio (<30 mg N/l) oriundo das próprias leveduras é capaz de suprir as necessidades das leveduras de segunda fermentação com mais eficácia que o nitrogênio exógeno.

Em relação à biomassa, esta aumenta em maiores proporções na fase logarítmica, mantendo-se estável ao longo da fermentação e ao final começou a abrandar, como era o esperado (VÁZQUEZ-LIMA *et al.*, 2014).

As fermentações realizadas a baixas temperaturas, isto é, 10-15°C pode não só melhorar a produção e a retenção de compostos voláteis do sabor, mas também aumentam a possibilidade de retardar ou parar o processo. Chiva *et al.* (2012) estudou a atividade de 10 genes relacionados a adaptação de *Saccharomyces* na fermentação alcoólica em baixas temperaturas, e como resultados relata que há uma sequência de genes que promovem maior resistência da levedura ao frio, principalmente na fase lag e na fase exponencial, onde as células estão favoráveis, pois embora haja nutrientes em grandes quantidades as células ainda estão em processo de aclimatação/adaptação. Para que isto fosse comprovado, os genes foram super-expressados e em outro momento, adicionados em outra estirpe, que apresentou similaridades.

4.1.3 Fase estacionária

É caracterizada por células velhas, mais resistentes a condições adversas, no qual a reprodução não é tão intensa. Nessa fase, o número de células viáveis é igual ao número de células inviáveis (CARVALHO, 2010). Na fase estacionária não há produção acentuada de gás carbônico e a produção de etanol torna-se mais lenta. Este acontecimento se dá pela ausência de grandes quantidades de açúcares e o esgotamento das fontes de nitrogênio. Fato interessante é que na fase estacionária o consumo de frutose é mais eficiente até que há seu esgotamento, culminando ao máximo de concentração de etanol ao meio (VÁZQUEZ-LIMA *et al.*, 2014).

Os resultados obtidos refletem na ausência do estabelecimento da fase estacionária, muito provavelmente afetada pela semeadura em tempos mais longos (a cada 24 horas). Santos (2009) afirma que, embora as fases geralmente ocorram quando acompanha-se o crescimento de micro-organismos, estas não são iguais, pois como avalia-se organismos vivos cada situação deve ser avaliada particularmente. A fase estacionária também poderá ser mais rápida se a temperatura não for controlada, o que não ocorreu durante a fermentação desta pesquisa, onde a temperatura foi mantida em 16°C.

4.1.4 Fase de declínio

Com o aumento da adversidade do meio, as células morrem em ritmo acelerado (fase de declínio, destruição ou morte), dando fim ao ciclo microbiano (CARVALHO, 2010). O final da fermentação se deve ao esgotamento das fontes de carbono entre outros fatores de suma importância. A glicose é a fonte de carbono preferido pelas leveduras, sendo metabolizado antes da frutose e, obviamente, com mais facilidade que a própria sacarose, esta precisando ser hidrolisada para que seu consumo seja realizado (VÁZQUEZ-LIMA *et al.*, 2014).

Em relação ao trabalho, para que os resultados fossem melhor expressos deveria haver o acompanhamento da morte dos micro-organismos até que a concentração celular de leveduras *Saccharomyces bayanus* fosse ínfima, assim afirmando com maior exatidão o final da fermentação alcoólica.

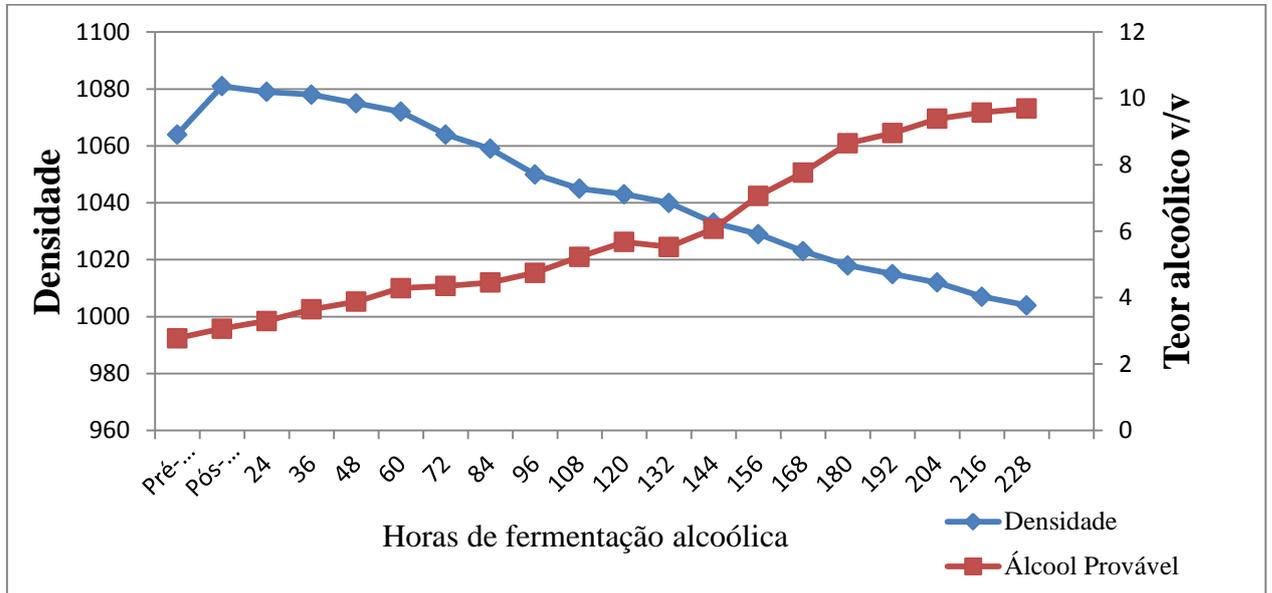
4.2 Consumo dos açúcares durante a fermentação alcoólica

Tilloy *et al.* (2014) descreve que há uma tendência no mercado mundial de vinhos para que o teor alcoólico seja mais baixo. Ao longo dos últimos vinte anos, o conteúdo de álcool nos vinhos aumentou consideravelmente (cerca de 2% v/v), como um resultado do elevado teor de açúcar nas uvas, sendo colhidas com maior grau de maturação. Uma estratégia viável relatada pelo mesmo autor Tilloy *et al.*, (2014) é a utilização de leveduras que produzam mais glicerol, em contrapartida diminuem a produção de etanol. Este trabalho acompanhou cerca de 200 gerações de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, no qual as últimas apresentavam resultados consideráveis e satisfatórios em relação a diminuição da produção de etanol. Para chegar a este resultado as leveduras foram submetidas a se desenvolver em KCl, porém os melhores resultados foram obtidos através de estirpes híbridas.

Gobbi *et al.* (2014) descreve que ao longo das últimas décadas tem havido um aumento progressivo do teor de etanol em vinhos devido à mudança climática global e para os novos estilos de vinho que estão associados com a maturidade da uva. Porém, altas quantidades de etanol podem influenciar em sensações desagradáveis e desequilíbrio dos vinhos. Leveduras geneticamente modificadas, evolução adaptativa de leveduras, e o uso de levedura não-*Saccharomyces* são opções para a diminuição do teor alcoólico. No presente estudo, foi investigado o desenvolvimento de leveduras não-*Saccharomyces* em ambiente anaeróbio. As leveduras *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces sapae*, *bailii* *Zygosaccharomyces* e *Zygosaccharomyces bisporus* promoveram reduções significativas na produção de etanol e mantiveram a eficiência de fermentação, quando comparadas à *Saccharomyces cerevisiae*.

No gráfico 2 é possível visualizar a queda da densidade contrastada com o aumento do teor de álcool provável, durante a fermentação alcoólica.

Gráfico 2 - Acompanhamento da fermentação alcoólica através da densidade do mosto/vinho e do álcool provável

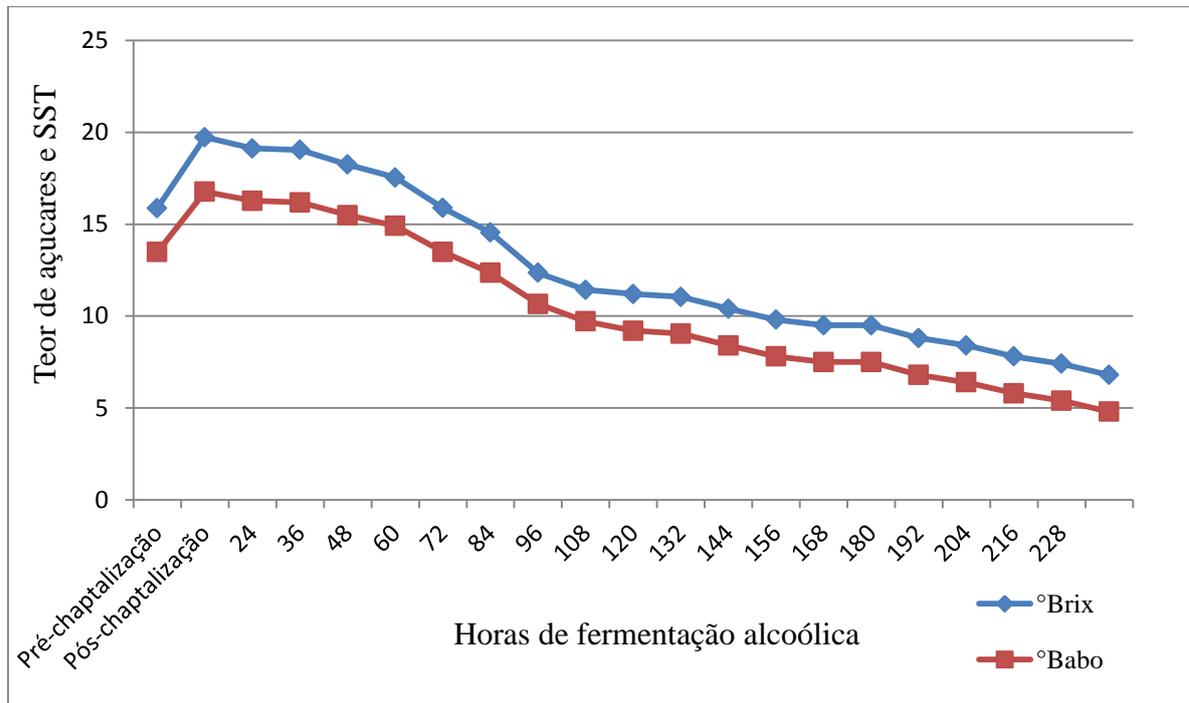


Fonte: Autor, 2014

Por vezes, quando há paradas de fermentação e ou quando os açúcares não são totalmente consumidos é utilizado algumas estirpes reiniciadoras. Em geral, o principal açúcar residual é a frutose. Sifuentes *et al.* (2014) fez comparações entre a temperatura da fermentação e o teor alcoólico já encontrado no vinho, onde os resultado demonstram que temperatura mais altas (20° a 30° C) são mais adequadas para o crescimento das leveduras quando o vinho possui mais que 12% v/v de etanol. Este resultado demonstra que ao final da fermentação alcoólica é adequado que a temperatura seja elevada para que o consumo dos açúcares seja o mais eficaz possível.

No gráfico 3 visualiza-se queda dos sólidos solúveis totais e teor açúcares durante a fermentação alcoólica.

Gráfico 3 - Concentração de Sólidos Solúveis Totais (°Brix) e teor de açúcares (°Babo) durante a fermentação alcoólica.



Fonte: Autor, 2014

Deficiências de nitrogênio em mostos são uma das principais causas de fermentações lentas. Atualmente, o método mais comum para lidar com fermentações com deficiência em nitrogênio é a adição de nitrogênio suplementar (normalmente fosfato de amônio). No entanto, é importante saber a exigência específica de azoto de cada estirpe, para evitar a adição excessiva que pode conduzir a instabilidade microbiana e acúmulo de carbamato de etila. Gutiérrez et al. (2012) avaliou a utilização de nitrogênio em diversas estipes de leveduras, sendo a estirpe comercial PDM e RVA as que apresentaram maior consumo, sendo a forma mais eficiente de obter este resultado é pela biomassa expressa durante a fermentação. Assim, pode-se dizer que estas diferenças na demanda de nitrogênio estão positivamente correlacionadas com a maior taxa de crescimento e maior taxa de absorção de nitrogênio. A marca comercial da levedura utilizada neste trabalho (PDM) é a mesma utilizada para que a micro vinificação fosse realizada, sendo adicionado nutriente comercial antes que a fermentação iniciasse.

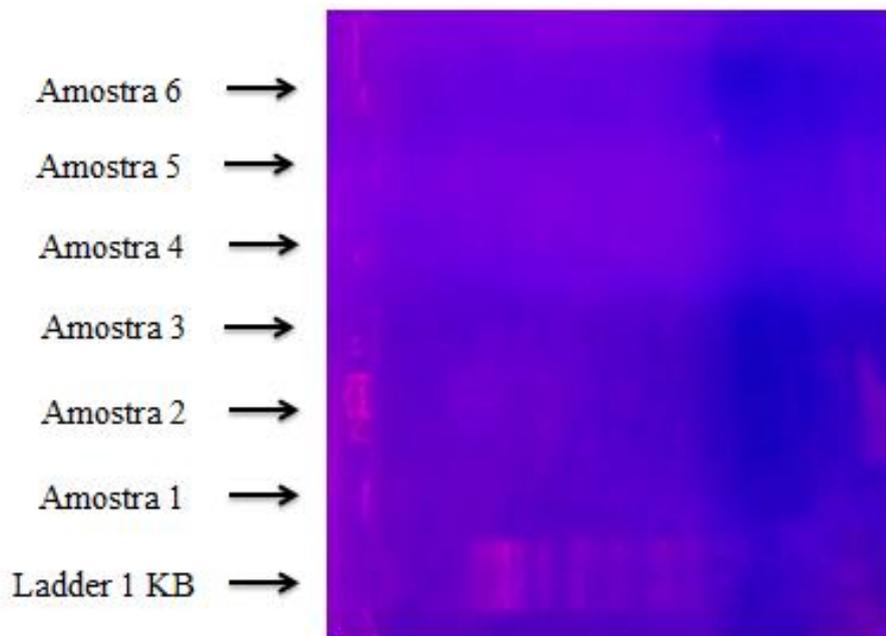
O controle de temperatura é um dos aspectos mais importantes no sucesso de uma vinificação, interferindo não somente no metabolismo das leveduras, com também na liberação de aromas e outros compostos. Lopez *et al.* (2014), indica que temperaturas mais baixas aumentam a complexidade aromática dos vinhos, testando em sua pesquisa o efeito de

um aminoácido específico (Triptofano) no desenvolvimento das leveduras e o resultado nas características dos vinhos. O Triptofano é codificado a partir dos genes da levedura e atua como inibidor do crescimento em baixas temperaturas, porém, Lopez *et al.* (2014) apontou que super-expressão do gene TAT2 e a deleção do gene TRP1, tornam este aminoácido em um auxiliador no desenvolvimento das leveduras, além de reduzir o consumo de nitrogênio ao longo da fermentação.

4.3 Extração de DNA Total

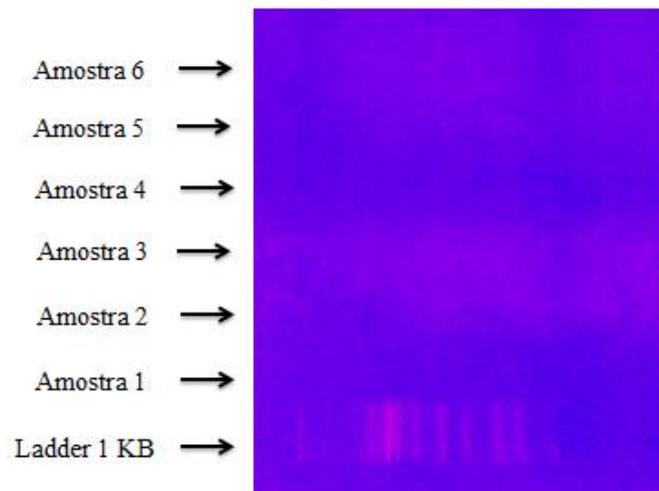
Embora tenha sido aplicado o protocolo de extração de DNA total de acordo com descrito por Anchorena-Matienzo (2002) os resultados obtidos não foram satisfatórios. Estima-se que a extração de DNA ocorreu de maneira eficiente, porém a visualização do material genético extraído foi prejudicada em função de equipamentos que não permitiram a correta visualização dos resultados. Fotos de géis de agarose com o material da extração de DNA podem ser observadas nas Figuras 7, 8 e 9.

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% com amostras de DNA total extraído a partir do vinho elaborado. Amostras de 1 à 6 são de vinho no 2º dia de fermentação. Ladder 1KB – marcador de peso molecular



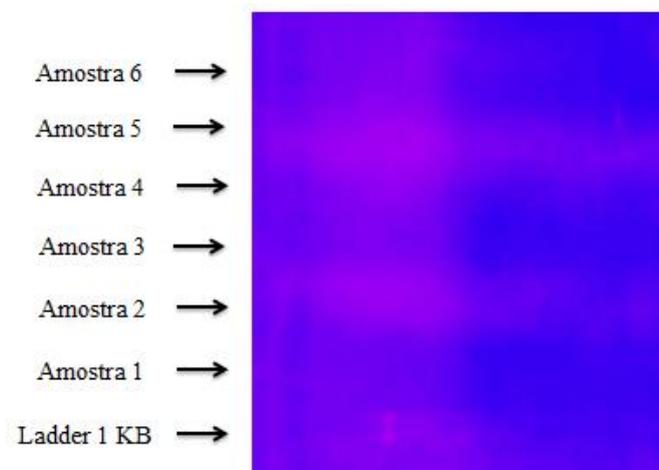
Fonte: Autor, 2014.

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose (Amostras obtidas do 3º dia de fermentação)



Fonte: Autor, 2014.

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose (Amostras obtidas do 5º e 6º dia de fermentação)



Fonte: Autor, 2014.

Utilizou-se transiluminador de marca UV Trans e atribuiu-se ao equipamento a principal dificuldade de visualização dos resultados. Estima-se que a extração tenha ocorrido com sucesso, porém a má visualização dos resultados não permitiu uma análise conclusiva com relação à quantidade de DNA extraído em cada um dos dias da fermentação alcoólica. Tal observação é pertinente uma vez que até mesmo o marcador Ladder 1 KB não teve boa resolução. Outras possibilidades de problemas podem ser atribuídas ao brometo de etídio (concentração elevada), ao gel de agarose (concentração utilizada) e aos tampões (utilizados na eletroforese) que, em diversas circunstâncias foram substituídos e que ainda assim não permitiram análise mais completa.

5 CONCLUSÃO

Em relação ao estabelecimento da curva de crescimento a fase de latência apresentou um período longo, provavelmente favorecido pela baixa temperatura de fermentação, recipientes com capacidade reduzida de estocagem e ausência de pequenas doses de oxigênio que poderiam potencializar a reprodução das leveduras. A fase log foi estabelecida de maneira esperada, onde a liberação de CO₂ e a concentração celular foram máximas. A fase estacionária não foi obtida, provavelmente pelo método de contagem das colônias (a cada 24 horas), denotando que sementeiras em tempos mais curtos resultariam em uma curva melhor delineada. A fase de declínio ocorreu pela diminuição gradual de células presentes no vinho em fermentação, entretanto seria pertinente o acompanhamento da concentração celular após o término da fermentação alcoólica. A extração de DNA genômico total não foi satisfatória, podendo ser elencado diversos fatores, tais como os materiais utilizados, excesso de sujidades oriundas de restos celulares e a baixa concentração de células dispersas nas amostras utilizadas para a extração.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biotecnologia tornou-se uma aliada para que vinificações tivessem maior controle, tanto no consumo de açúcares pelas leveduras quanto na extração de distintos compostos sensoriais oriundos dos micro-organismos. Através da manipulação genética das leveduras é possível modificar características sensoriais e físico-químicas dos vinhos, almejando potencializar os processos industriais. O trabalho acompanhou a curva de crescimento de leveduras *Saccharomyces bayanus* ao longo da fermentação alcoólica como estratégia de promover práticas nas vinícolas que sejam benéficas à reprodução das mesmas, além de fazer correlações sobre as ocorrências envolvidas neste processo. A extração de DNA é o início do processo para análise genômica, etapa fundamental para que a biotecnologia seja, de fato, realizada e testada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁLVAREZ-PÉREZ, J. M. CAMPO, E.; SAN-JUAN, F.; COQUE, J. J.; FERREIRA, V. y HERNÁNDEZ-ORTE, P. **Sensory and chemical characterisation of the aroma of Prieto Picudo rosé wines: The differential role of autochthonous yeast strains on aroma profiles.** Food Chemistry, 2012.
- AMARANTE, J. O. A. **Os segredos do vinho: para iniciantes e iniciados.** Mescla Editorial, 2005.
- ANCHORENA-MATIENZO, P. Re-identificação e caracterização genética da levedura IZ-987 utilizando marcadores moleculares. Piracicaba, 2002.
- BADOTTI, F.; DÁRIO, M. G.; ALVES, S. L.; LUIZA, M.; CORDIOLI, A.; MILETTI, L. C.; ARAUJO, P. S.; STAMBUK, B. U. **Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*.** Microbial Cell Factories, 2008.
- BARRERA, E. O. **Aislamiento, selección e identificación de levaduras enológicas nativas no-Saccharomyces en viñedos establecidos en Querétaro.** México, 2013.
- BEKETOROU, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A. **Production of food grade yeasts.** Food Technol Biotechnon, 2006.
- BELDA, I.; NAVASCUÉS, E.; ALONSO, A.; MARQUINA, D.; SANTOS, A.; **Microbiología del proceso de vinificación: selección de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas con óptimas propiedades enológicas.** Departamento de Microbiología-III. Facultad de Ciencias Biológicas. 2014.
- BINNECK, E. **As ômicas: Integrando a bioinformação.** Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, 2004.
- BOULTON, R. B.; SILGLETON, V. L.; BISSON, L. F.; KUNKEE, R. E. **Teoría y Práctica de la Elaboración Del Vino.** Zaragoza, 2002.
- BURKE, D.; et al. **Methods in Yeast Genetics.** 2000 ed, ed. A.C.S.H.L.C. Manual, 1998.
- CAMPBELL, M.K., **Biochemistry,** ed. H.B. Company, 1999.
- CARVALHO, I. T. **Microbiologia Básica.** Pernambuco, 2010.
- CASAL, M.; SCHULLER, D.; PAIS, C. **Métodos moleculares de identificação de levaduras do vinho.** 2004.
- CHAMBERS, P. J. Y PRETORIUS, I. S. **Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research.** EMBO Reports, 2010.
- CHIVA, R.; LÓPEZ-MALO, M.; SALVADÓ, Z.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M. **Analysis of low temperature-induced genes (LTIG) in wine yeast during alcoholic fermentation.** FEMS, 2012.

DARRICARRÈRE, A. C.; **Influência organoléptica da adição de diferentes doses de manoproteínas parietais levedurianas em vinho fino tinto Sangiovese da safra de 2005 da Serra Gaúcha.** Bento Gonçalves, 2006.

DI TORO, M. R.; CAPOZZI, V.; BENEDUCE, L.; ALEXANDRE, H.; TRISTEZZA, M.; DURANTE, M.; MARIA TUFARIELLO, M.; GRIECO, F.; SPANO, G. **Intraspecific biodiversity and 'spoilage potential' of *Brettanomyces bruxellensis* in Apulian wines.** 2015.

DUMAS, M. E; et al. **Assessment of Analytical Reproducibility of ¹H NMR Spectroscopy Based Metabonomics for Large-Scale.** Analytical Chemistry, 2006. 7: p. 2199-2208.

ERIKSSON, L.; *et al.* **Using chemometrics for navigating in the large data sets of genomics, proteomics, and metabonomics (gpm).** Anal Bioanal Chem, 2004. 380(3): p. 419-29.

FERREIRA. A. **Biologia molecular básica**, 3ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2001.

FLEET, G. H. **Wine yeasts for the future.** FEMS Yeast Research, 2008.

FORSTER, J.; et al. **Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network.** Genome Res, 2003. 13(2): p. 244-53.

FRICK, O.; WITTMANN, C. **Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative ¹³C flux analysis.** *Microb Cell Fact*, 2005.

GABBARDO, M.; **Borras finas e manoproteínas na maturação de vinho tinto Cabernet Sauvignon.** Pelotas, 2009.

GARCÍA V. **Introducción a la microbiología.** Universidad Estatal a Distancia. San José, Costa Rica, 2004.

GERBAUX, V.; et. al. **Influence of Inoculation with Malolactic Bacteria on Volatile Phenols in Wines.** Am J Enol Vitic, 2009.

GIOVANNINI, E. **Manual de Viticultura.** Porto Alegre, 2014. pg. 228.

GIRARD, G. **Bases Científicas y Tecnológicas de La Enología.** p. 47, Zaragoza, 2004.

GIRARD, S. **Vinhos do Mundo.** Paris, 2008.

GIUDICI, P.; SOLIERI, L.; PULVIRENTI, .M. Y CASSANELLI, S. **Strategies and perspectives for Genetic improvement of wine yeasts.** Applied Microbiology and Biotechnology, 2005.

GOBBI, M.; DE VERO, L.; SOLIERI, L.; COMITINI, F.; ORO, L.; GIUDICI, P.; CIANI, M. **Fermentative aptitude of non-*Saccharomyces* wine yeast for reduction in the ethanol content in wine.** European Food Research and Technology, 2014.

GONZÁLEZ, S. S.; BARRIO, E.; GAFNER J. Y QUEROL, A. **Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations.** FEMS Yeast Research, 2006.

GUTIÉRREZ, A.; CHIVA, R.; SANCHO, M.; BELTRAN, G.; ARROYO-LÓPEZ, F. N.; GUILLAMON, J. M. **Nitrogen requirements of commercial wine yeast strains during fermentation of a synthetic grape must.** ELSIVIER, 2012.

GYGI, S. P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B. R.; AEBERSOLD, R. **Correlation between protein and RNAm abundance in yeast.** 2003.

IBAÑES, C.; PÉREZ-TORRADO, R.; CHIVA, R.; GUILLAMÓN, J. M.; BARRIO, E.; QUEROL, A. **Comparative genomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from fermentations of traditional beverages unveils different adaptive strategies.** 2014.
JAMES, P. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. Q Rev Biophys, 1997.

JENNIFER, R.; BELLON, J. R.; SCHMID, F.; CAPONE, D. L.; DUNN, B. L.; CHAMBERS, P. J. **Introducing a New Breed of Wine Yeast: Interspecific Hybridisation between a Commercial *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast and *Saccharomyces mikatae*.** Plos One, 2013.

KAVANAGH K. **Fungi: Biology and Applications.** Editorial John Wiley & Sons. Chichester. Reino Unido, 2011.

KORSHUNOVA, I.V.; NAUMOVA, E. S.; NAUMOV, G. I. **Comparative molecular genetic analysis of β -fructosidases of yeasts *Saccharomyces*.** *Mol Biol*, 2005.

LINDON, J.C.; et al. **The handbook of metabonomics and metabolomics.** Edición de Elsevier ed. 2007. p. 561.

LOPEZ, M. L.; RIOS, E. G.; CHIVA, R.; GUILLAMON, J. M.; RAGA, M. M. **Effect of Deletion and Overexpression of Tryptophan Metabolism Genes on Growth and Fermentation Capacity at Low Temperature in Wine Yeast.** Wiley Online Library, 2014.

LOSCOS, N.; HERNANDEZ-ORTE, P.; CACHO, J. Y FERREIRA, V. **Release and formation of varietal aroma compounds during alcoholic fermentation from non floral grape odorless flavor precursors fractions.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007.

MEDINA K., FARIÑA L., CAPRA A., PEREZ G., FERRERI L., CONIBERTI A., JUBANY S., BOIDO E., DISEGNA E., GAGGERO C., DELLACASSA E., HENSCHKE P.A. Y CARRAU F.M. **Impacto del uso de levaduras nativas seleccionadas en la enología de mínima intervención.** Revista Enología, 2007.

MEDINA, K.; BOIDO, E.; DELLACASSA, E.; CARRAU, F. **Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation.** International Journal of Food Microbiology, 2012.

MORENO-GARCÍA, J.; GARCÍA-MARTÍNEZ, T.; MORENO, J.; MILLÁN, M. C.; MAURICIO, J. C. **A proteomic and metabolomic approach for understanding the role of the flor yeast mitochondria in the velum formation.** 2014.

Mostert, T. T.; Divol, C. **Investigating the proteins released by yeasts in synthetic wine fermentations.** 2014.

MULLER, J. L.; PROTTI, K. L.; MACHADO, M. S.; LACERDA, L. L. V., BRESOLIN, T. M. B.; PODLECH, P. S. **Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo air lift e shaker.** Campinas, 2007.

NAUMOV, G.I.; NAUMOVA, E. S.; SANCHO, E. D.; KORHOLA, M. P. **Polymeric *SUC* genes in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEMS Microbiol Lett*, 1996.

NIELSEN, J.; OLIVER, S. **The next wave in metabolome analysis.** *Trends in Biotechnology*, 2005. 23(11): p. 544-546.

PISKUR, J.; LANGKJAER, R.B. **Yeast genome sequencing: the power of comparative genomics.** *Molecular Microbiology*, 2004. 53(2): p. 381-389.

PORTELL, X.; GINOVART, M.; CARBÓ, R.; VIVES-REGO, J. **Differences in stationary-phase cells of a commercial *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast grown in aerobic and microaerophilic batch cultures assessed by electric particle analysis, light diffraction and flow cytometry.** Society for Industrial Microbiology, 2010.

POUSSIER, O. **Le Grand Larousse du Vin.**p. 61, França, 2010.

PRETORIUS, I. S. HOJ, P. B.; **Grape and wine biotechnology: Challenges, opportunities and potential benefits.** Austral Grape Wine, 2005.

PRETORIUS, I. S. **Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the Ancient art of winemaking.** Universidad Complutense de Madrid, 2000.

PRETORIUS, I. S. TOIT, M.; RENSBURG, P. **Designer yeasts for the fermentation industry of the 21 st century.** FoodTechnol. Biotechnol, 2003.

RAGA, M. M.; SANCHO, M.; GUILLAMÓN, J. M.; MAS, A.; BELTRAN, G. **The effect of nitrogen addition on the fermentative performance during sparkling wine production.** ELSEVIER, 2014.

RANKINE, B. **Manual Práctico de Enología -Microbiología y Fermentación.** p. 123, Zaragoza, 2000.

RAY, B. **Fundamental Food Microbiol.** CRCPress, p. 173-181, 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.

RODRÍGUEZ, M. E. **Análisis genómico y molecular de levaduras vínicas. Aplicación a la mejora del proceso de fermentación de vinos mediante selección de levaduras autóctonas.** Universidad de Cádiz, 2007.

ROLLAND, F.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J.M. **Glucose-sensing and –signaling mechanisms in yeasts.** *FEMS Yeasts Res*, 2002.

RUBIN G. M., et al. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*, 2000.

SANTOS, C. H. **Estudo Protocolar por RMN na Análise do Metaboloma das *Saccharomyces cerevisiae*.** Universidade de Aveiro, 2009.

SANTOS, D.; GELINSKI, J. M. L. N. **Culturas Iniciadoras de fermentação em vinhos.** Joaçaba, 2008.

SCHULER, D.; CASAL, M. **A utilização de estirpes de leveduras geneticamente modificadas em enologia.** Braga, Portugal, 2006.

SCHULLER, D. Y CASAL, M. **The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005.

SIFUENTES, L. R.; LERMAA, J. B. P.; QUIÑONESA, O. M. R.; CONTRERASA, J. A. R.; BACAB, E. R.; SÁNCHEZ, G. G.; BARRIOD, E.; SOTO, N. O. **Identification of a yeast strain as a potential stuck wine fermentation restarter: a kinetic characterization.** *CyTA - Journal of Food*, 2014.

SWIEGERS, J. H.; CAPONE, D. L.; PARDON, K. H.; ELSEY, G. M.; SEFTON, M. A.; FRANCIS, I. L. Y PRETORIUS I. S. **Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma.** *Yeast*, 2007.

TERRAL, J. F.; TABARD, E.; BOUBY, L.; IVORRA, S.; PASTOR, T.; FIGUEIRAL, I.; PICQ, S.; CHEVANCE, J. B.; JUNG, C.; FABRE, L.; TARDY, C.; COMPAN, M.; BACILIERI, R.; LACOMBE, T. Y THIS, P. **Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome.** 2010.

TILLOY, V.; ORTIZ-JULIEN, A.; SYLVIE DEQUIN, S. **Reducing ethanol and improving glycerol yield by adaptive evolution of *saccharomyces cerevisiae* wine yeast under hyperosmotic conditions.** *American Society for Microbiology*, 2014.

TOFALO, R.; PERPETUINI, G.; FASOLI, G.; SCHIRONE, M.; ALDO CORSETTI, A.; SUZZI, G. **Biodiversity study of wine yeasts belonging to the “terroir” of Montepulciano d'Abruzzo “Colline Teramane” revealed *Saccharomyces cerevisiae* strains exhibiting atypical and unique 5.8S-ITS restriction patterns.** 2014.

TONIETTO, J. **Afinal o que é Terroir?** Flores da Cunha, 2007.

TORIJA, M. J. **Ecología de levaduras: selección y adaptatación a fermentaciones vínicas.** Tarragona, 2002.

TRABALZINI, L.; PAFFETTI, A.; SCALONI, A.; TALAMO, F.; FERRO, E.; CORATZA, G.; BOVALINI, L.; LUSINI, P.; MARTELLI, P.; SANTUCCI, A. **Proteomic response to physiological fermentation stresses in a wild-type wine strain of *Saccharomyces cerevisiae***. Biochemical Society, 2003.

UGLIANO, M.; BARTOWSKY, E. J.; MCCARTHY, J.; MOIO, L. Y HENSCHKE, P. A. **Hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during fermentation with three *Saccharomyces* yeast strains**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006.

VÁZQUEZ-LIMA, F.; PAULINA SILVA, P.; BARREIRO, A.; MARTÍNEZ-MORENO, R.; MORALES, P.; QUIRÓS, M.; GONZÁLEZ, R.; ALBIOL, J.; PAU FERRER, P. **Use of chemostat cultures mimicking diferente phases of wine fermentations as a tool for quantitative physiological analysis**. Microbial Cell Factories, 2014.

VICENTE, M. A **Caracterização molecular e bioquímica de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na fabricação de cachaça de alambique**. Ouro Preto, 2007.

VIEIRA, T. **Relatório: técnicas de contagem Pour-Plate e Spread-Plate**. 2008. Disponível em: < <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAHHq4AB/relatorio-tecnicas-contagem-pour-plate-spread-plate>> Acesso em: 31/10/2014.

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. **Análise do Metaboloma – Uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica**. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento ano IX - nº 36, 2006.

WALKEY, C. J.; LUO, Z.; MADILAO, L. L.; , VUUREN, H. J. J. V. **The Fermentation Stress Response Protein Aaf1p/Yml081Wp Regulates Acetate Production in *Saccharomyces cerevisiae***. Plos One, 2012.

WLODARCZYK, S. R.; SOUZA, R. C.; BONFIM, T.; BRAND, D.; SILVA, G. A. **Avaliação de Leveduras Isoladas na Região de Pinto Bandeira, Bento Gonçalves (RS) com relação à Produção de H₂S e Velocidade de Fermentação**. Bento Gonçalves, 2012.

ZHANG, H.; RICHARDS, K. D.; WILSON, S.; LEE, S. A.; SHEEHAN, H.; RONCORONI, M.; GARDNER, R. C. **Genetic characterization of strains of *Saccharomyces uvarum* from New Zealand wineries**. 2015.

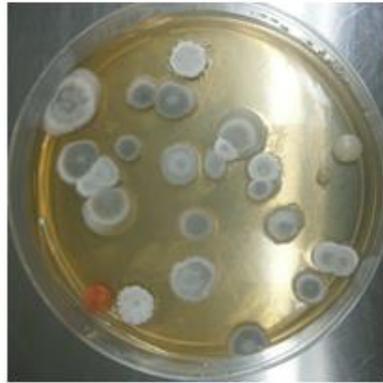
ZOECKLEIN, B.; FUGELANG, K.; GUMP, B.; NURY, F. **Análisis y Producción de Vino**. p. 289, Zaragoza, 2001.

APÊNDICES

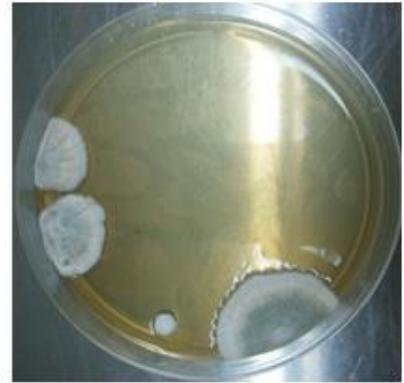
Crescimento dos micro-organismos presentes no mosto antes do inóculo da levedura selecionada.



Diluição de 1 ml de mosto



Diluição 10^{-1}



Diluição 10^{-2}

Crescimento dos micro-organismos presentes no mosto 24 horas após o inóculo da levedura selecionada.



Diluição de 1 ml de mosto



Diluição 10^{-1}



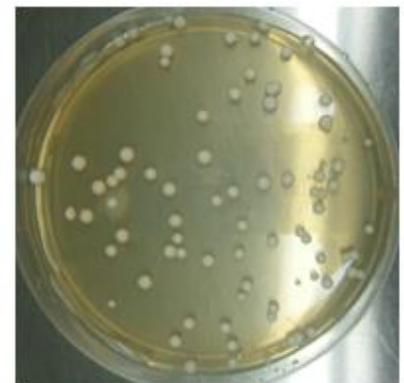
Diluição 10^{-2}



Diluição 10^{-3}



Diluição 10^{-4}



Diluição 10^{-5}

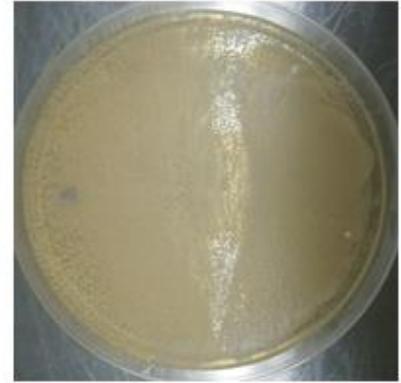
Crescimento dos micro-organismos no 3º dia de fermentação alcoólica.



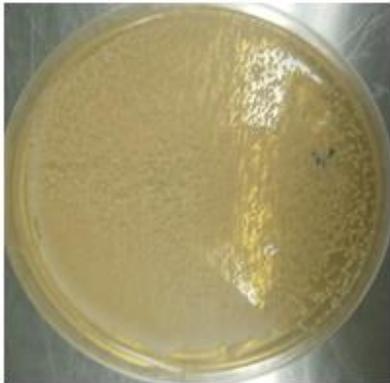
Diluição de 1 ml de mosto



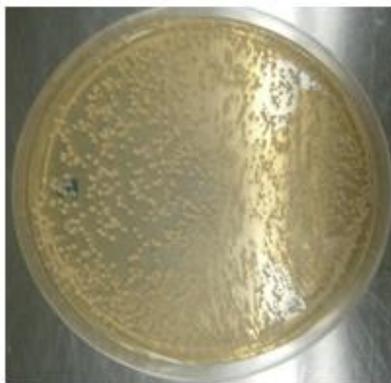
Diluição 10⁻¹



Diluição 10⁻²



Diluição 10⁻³



Diluição 10⁻⁴



Diluição 10⁻⁵