



**UFOP**

Universidade Federal  
de Ouro Preto

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
ESCOLA DE NUTRIÇÃO  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS**

**PAULO HENRIQUE NOLASCO**

**POTENCIAL USO DE LEVUDURAS ISOLADAS DE DORNAS DE  
FERMENTAÇÃO DE CACHAÇA PARA A FABRICAÇÃO DE VINHOS**

Ouro Preto  
Julho, 2022

PAULO HENRIQUE NOLASCO

**POTENCIAL USO DE LEVUDURAS ISOLADAS DE DORNAS DE  
FERMENTAÇÃO DE CACHAÇA PARA A FABRICAÇÃO DE VINHOS**

Trabalho de conclusão de curso do curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Ouro Preto fornecido pelo DEALI (Departamento de Alimentos), como parte das exigências para a obtenção do título de Cientista e Tecnólogo(a) de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Aureliano Claret da Cunha

Ouro Preto  
Julho, 2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

N787p Nolasco, Paulo Henrique.

Potencial uso de leveduras isoladas de dornas de fermentação de cachaça para a fabricação de vinhos. [manuscrito] / Paulo Henrique Nolasco. - 2022.

51 f.: il.: , gráf., tab..

Orientador: Prof. Aureliano Claret Cunha.

Produção Científica (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos .

1. Leveduras. 2. Biotecnologia. 3. Vinho. I. Cunha, Aureliano Claret. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 663.2

Bibliotecário(a) Responsável: Luciana Matias Felício Soares - SIAPE: 1.648.092



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Paulo Henrique Nolasco**

**"Potencial uso de leveduras isoladas de dornas de fermentação de cachaça para produção de vinhos"**

Monografia apresentada ao Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 27 de julho de 2022

### Membros da banca

Prof. Dr. Aureliano Claret da Cunha - Orientador (Universidade Federal de Ouro Preto)  
MSc. Isabela Peregrino - (Viácea Enológica)  
MSc. Marcos de Oliveira (Instituto Federal Norte de Minas - Campus Salinas)

Aureliano Claret da Cunha, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 27/08/2022



Documento assinado eletronicamente por **Aureliano Claret da Cunha, CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS/ENUT**, em 09/02/2023, às 13:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0472422** e o código CRC **8E3D0CE8**.



## **AGRADECIMENTOS**

À UFOP e ao DEALI pelo ensino público de qualidade.

À agência de fomento científico e tecnológico FAPEMIG, pelo suporte financeiro.

À toda equipe do LBCM principalmente Zezé, Aureliano, Rogelio, Izinara, Késia, Bianca, Ludmila, Laís sempre muito prestativos e atenciosos.

Ao professor Dr. Aureliana Claret da Cunha pela oportunidade, orientação e conhecimento transmitido.

A gratidão que sinto por tudo e todos os momentos que vivi até aqui não pode ser traduzida em palavras. Em primeiro lugar agradeço meus pais Simone e Edson, Leila e "Zeli", que foram minha fortaleza e me incentivaram a lutar pelo meu sonho. A toda família Paes/Nolasco pela força. A Duda, minha amada companheira, e toda a família Vilhena pelo carinho.

À República Pronto Socorro por todo suporte, aprendizado e irmandade durante todos esses anos, em especial ao Elielton, Xiko, Ricardo, Talles, Vaguinho, Ção.

Aos meus amigos de Rio Claro e Ouro Preto pela companhia de sempre.

## RESUMO

Segundo a legislação brasileira, vinho é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples da uva sã, fresca e madura. Desde os primórdios, o vinho é obtido pela fermentação com uso de leveduras selvagens, naturalmente presentes na matéria prima, no entanto, com avanço dos estudos relacionados ao setor, a tendência da indústria vitivinícola está voltada para a utilização de linhagens de leveduras selecionadas, comumente da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, com objetivo de garantir a qualidade dos produtos, e mitigar custos de processamento. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial uso de leveduras isoladas de dornas de fermentação de cachaça para a fabricação de vinhos. Para tal, 217 cepas da coleção de leveduras do LBCM foram avaliadas quanto à capacidade de fermentação, crescimento em diferentes fontes de carbono (Frutose e Glicose), perfil de floculação, e resistência frente as diversas condições de estresse inerentes ao processo de fermentação do mosto de uva, como: Tolerância à diferentes valores de pH e temperatura (°C), e presença de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>). Também foram avaliados os desempenhos das cepas em relação aos aspectos qualitativos do vinho, pelo potencial fisiológico de produção de ésteres e álcoois superiores, bem como o baixo potencial de síntese de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S). Dentre as 217 cepas analisadas, 4 expressaram alto potencial biotecnológico para a produção de vinho tinto. Entre elas, 2 linhagens destacaram-se em função da polivalência frente as condições de estresse testadas, ótimo desempenho nos testes relacionados a produção de compostos aromáticos, somado a inexpressiva produção de dióxido de enxofre, e capacidade de fermentar frutose.

**Palavras-chave:** *Saccharomyce cerevisiae*, Biotecnologia, Vitivinicultura, Ciência e Tecnologia de Alimentos.

## ABSTRACT

According to the Brazilian legislation, wine is the beverage obtained by the alcoholic fermentation of the simple must of sound, fresh and ripe grapes. Since the beginning, the wine is obtained with the use of wild yeasts, naturally present in the raw material, however, with the advance of the studies related to the sector, the trend of the wine industry is directed towards the use of selected yeast strains, usually of the species *Saccharomyces cerevisiae*, in order to ensure product quality, and mitigate processing costs. To this aim, 217 strains from the yeast collection of LBCM were evaluated regarding the fermentation capacity, and growth in different carbon sources (Fructose and Glucose), flocculation profile, resistance to several stress conditions inherent to the fermentation process of grape must, such as: tolerance to different pH values and temperature (°C), and presence of sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>). The performance of the strains was also evaluated regarding to the qualitative aspects of the wine, by the physiological potential for the production of esters and higher alcohols, as well as the low potential for hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) synthesis. Among the 217 strains analyzed, 4 expressed high biotechnological potential for wine production. Among them, 2 strains stood out due to their polyvalence under the stress conditions tested, excellent performance in tests related to the production of aromatic compounds, plus the inexpressive production of sulfur dioxide, and ability to ferment fructose.

**PRATICAL APPLICATION:** This research can bring new perspectives to produce wine from yeast isolated from Brazilian ecosystem.

**KeyWords:** *Saccharomyce cerevisiae*, Biotechnology, Viticulture, Food Science and Technology.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Resultado percentual dos testes de resistência as condições estressantes: Alta osmolaridade, concentração de etanol, sulfito, e diferentes temperaturas.....21

**Tabela 2:** Resultado percentual do teste de resistência a diferentes valores de pH.. .....22

**Tabela 3:** Cepas selecionadas com base nas características fenotípicas relacionadas à resistência às condições estressantes, e apresentem alto potencial de produção de compostos aromáticos foram expressas (Conjunto A). Selecionadas em função do potencial de produção de compostos aromáticos (Conjunto B) .....26

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**°Brix:** Escala numérica de índice de refração de uma solução, utilizada para determinar a quantidade de sólido dispersa nesta solução. Define-se a equivalência de 1 grau Brix (1°Bx) á 1 grama de açúcar por

**A.E.C:** Antes da Era Comum

**EPAMIG:** Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais

**LBCM:** Laboratório de Biologia Celular e Molecular

**H<sub>2</sub>S:** Sulfeto de hidrogênio

**MAPA:** Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

**PFP:**  $\rho$ -fluoro-DL-fenilalanina

**ppm:** Parte por milhão, quantidade em grama de soluto presente em 1000000 gramas de solução. (ppm = mg/kg =  $\mu$ g/g =  $\mu$ g/mL = mg/litro)

**SO<sub>2</sub>:** Dióxido de Enxofre

**TFL:** 5',5',5' -trifluoro-DL-leucina

**UFOP:** Universidade Federal de Ouro Preto

**YNB:** Yeast nitrogen base (YNB), base com sulfato de amônia e sem aminoácido, para preparo de meio mínimo sintético

**YPD 2%:** Yeast Extract Peptone Dextrose 2%: composto por extrato de levedura 1% (p/v), peptona bacteriológica 2% (p/v), glicose 2% (p/v) como fonte de carbono, ágar 2% (p/v).

**YPF 2%:** Yeast Extract Peptone Fructose 2%: composto por extrato de levedura 1% (p/v), peptona bacteriológica 2% (p/v), frutose 2% (p/v) como fonte de carbono, ágar 2% (p/v).

# SUMÁRIO

<b>I.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>II.</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>18</b>
	2.1 Placa Mãe	18
	2.2 Crescimento em Diferentes Fontes de Carboidratos	19
	2.3 Testes de Sensibilidade às Condições de Estresse	19
	2.4 Teste de produção de H <sub>2</sub> S	20
	2.5 Teste de resistência ao 5,5,5-trifluoro-DL-leucina (TFL)	20
	2.6 Teste de resistência a Cerulenina	20
	2.7 Pré-Seleção	21
	2.8 Teste qualitativo de floculação	21
	2.9 Teste fermentativo em Tubos de Durham	22
	2.10 Teste fermentativo Tubos de Durham, adicionado de Antimicina	22
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>22</b>
	3.1 Capacidade de Metabolizar Frutose e Glicose	22
	3.2 Resistência as Condições de Estresse	23
	3.3 Sulfeto de Hidrogênio (H <sub>2</sub> S)	26
	3.4 Teste Relacionado a Produção de Compostos Aromáticos: TFL e Cerulenina	27
	3.5 Pré-Seleção	28
	3.6 Floculação	30
	3.7 Potencial de Fermentação	30
<b>IV.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>31</b>
<b>V.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>32</b>
<b>VI.</b>	<b>APÊNDICE 1: INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>VII.</b>	<b>APÊNDICE 2: TABELA DOS RESULTADOS</b>	<b>38</b>
<b>VIII.</b>	<b>APÊNDICE 3: REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>40</b>
	8.1 Histórico	40
	8.2 Legislação	42
	8.3 Processo Produtivo	43
	8.3.1 Colheita e Desengace	43
	8.3.2 Esmagamento e Maceração	46
	8.3.3 Fermentação alcohólica	46
	8.3.4 Fermentação Malolática	48
	8.3.5 Correções e estabilizações	48
	8.4 REFERÊNCIAS	50



## I. INTRODUÇÃO

De acordo com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, pelo disposto na Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, no Decreto nº 8.198, de 20 de fevereiro de 2014, vinho é a bebida obtida por meio da fermentação alcoólica do mosto simples da uva sã, fresca e madura. Podendo ser subdivididos em termos de classe: Vinho de Mesa, Vinho Frisante, Vinho Leve, Vinho Fino, Espumante Natural, Vinho Gaseificado, Vinho Licoroso e Vinho Composto. A classe dos finos e de mesa, podem ainda ser subdivididas de acordo com a concentração de açúcar residual, expresso em gramas de glicose por litro, em: Seco (0 - 4 g/L), Demi-Sec (4 - 25 g/L) e, Suave (>25 g/L) para vinhos de mesa, sendo estipulado o limite superior de 80 g/L para vinhos finos suave.

A definição da composição dos vinhos é improvável, uma vez que se trata de uma solução altamente complexa, formada por milhares de compostos oriundos de interações físico-químicas e bioquímicas, envolvendo vias metabólicas de agentes microbiológicos e vegetais. Levando em consideração a composição média do vinho, podemos afirmar que a água (87%) e o álcool etílico (11%) são os principais componentes da bebida, expresso em massa por volume (p/v). Em seguida, apresenta-se os elementos traço, entre eles as vitaminas, aminoácidos, sacarídeos e minerais (1%), seguido pelos ácidos orgânicos (0,5%) majoritariamente o ácido tartárico, e pelo conjunto de compostos voláteis (0,5%), com destaque aos álcoois superiores, ésteres, cetonas, polifenóis e os ácidos graxos de cadeia curta (SUMBY et al., 2009). Em relação a composição aromática e olfativas do produto final, os grupos de maior relevância são os álcoois superiores, ésteres, compostos carbonílicos (cetona e aldeído), e os ácidos orgânicos extraídos do tecido vegetal das uvas durante

o processo (ácido tartárico, málico, cítrico e ascórbico), tal qual, os ácidos sintetizados pelos microrganismos viáveis presente no mosto de uva (ácido acético, succínico, pirúvico e lático) (ROCHA *et al.*, 2003; AZÊVEDO *et al.*, 2007).

Dentre os fatores que afetam a composição química e sensorial do vinho, podemos destacar: o tempo e as condições de envelhecimento da bebida; método de processamento empregado; o *Terroir*, como é denominado os elementos que interferem na composição molecular da uva e do vinho, que engloba os fatores inerentes a região de plantio das videiras (clima, composição solo, altitude), ponto de colheita (maturação tecnológica e fenólica), tecnologia de manejo e as espécies das uvas; características da microbiota atuantes nas fermentações. Trabalhos recentes no campo da biotecnologia aplicado à vitivinicultura, evidenciam o papel fundamental das características genéticas e fisiológicas dos agentes biológicos inoculados que atuarão ao longo da fermentação alcoólica, tanto em relação aos aspectos qualitativos, como acerca do rendimento do processo (VALENTIN, 2019; VENTURINI FILHO, 2016; RAINIERI, PRETORIUS 2000).

Pode-se determinar como pontos críticos de processamento do vinho de fino e de mesa: a determinação do ponto de colheita das uvas (fenólica e tecnológica); prensagem e maceração; bem como a fermentação alcoólica e malolática (REZENDE *et al.*, 2014). A figura 4 expressa no Apêndice 3, representa o fluxograma de produção de vinho tinto e branco.

A fermentação alcoólica pode ser considerada como a principal etapa no processo produtivo de bebidas fermentadas como na vinificação. Tal qual a metabolização aeróbica dos açúcares (respiração), preferencial para as leveduras na presença de oxigênio em função de um maior saldo energético (ATP) ao final da

fosforilação oxidativa. A via metabólica fermentativa parte do piruvato, resultante do catabolismo das hexoses pela via glicolítica e tem como objetivo gerar energia química para realização das reações celulares. Assim como evidenciado por Luis Pasteur no século XIX, em suma, pode-se dizer que a fermentação alcoólica é um processo biológico de transformação química, catalisada por enzimas a nível citoplasmático, onde ocorre a conversão das fontes de carbono fermentescíveis (D-glicose e D-frutose) em etanol ( $C_2H_6O$ ) e dióxido de carbono ( $CO_2$ ), com consequente formação de ATP. (JACKSON, 2018; MORENO-ARIBAS, POLO, 2009; STANIER *et al.*, 1969).

Entretanto, o conjunto de reações que compõem a etapa denominada de fermentação alcóolica é extremamente complexa, envolvendo a síntese de diversos compostos além do metabólito primário (etanol), fundamentais para a composição sensorial do vinho. Estes metabólitos são denominados de secundários, sendo os mais relevantes para a caracterização do vinho os álcoois superiores, ésteres, compostos carbonílicos, glicerol, ácido succínico, diacetil, acetoína, 2,3-butanodiol. Além disso, outras reações químicas envolvendo os metabólitos microbianos e os componentes oriundos do extrato da uva ocorrem simultaneamente, fazendo que no final, ocorra a transformação do mosto de uva em uma solução alcóolica denominada vinho (JACKSON, 2018; MORENO-ARIBAS, POLO, 2009).

Álcool superior representa um vasto grupo de metabólitos altamente representativo nas produções de bebidas fermentadas. Entretanto, em altas concentrações, estes acarretam características olfativas desagradáveis (LA FUENTE BLANCO, 2016). Em concentrações moderadas, estes metabólitos são fundamentais para composição sensorial do vinho, contribuindo positivamente para os aspectos aromáticos, principalmente após sofrerem reações de esterificação (CORDENTE *et*

*al.*, 2018). Segundo Duenãs-Sánchez e colaboradores (2014), a via de biossíntese dos aminoácidos aromáticos e alifáticos, precursores dos álcoois superiores, é modulada pela concentração do produto das reações.

Mecanismos de seleção de cepas com alta capacidade de produção destes compostos aromáticos e alifáticos veem sendo desenvolvidas. Uma das estratégias validada em diversos trabalhos de seleção e melhoramento de leveduras *Saccharomyces ssp*, se baseia na triagem fenotípica de linhagens que não apresentam inibição retroativa frente ao acúmulo dos aminoácidos, precursores dos compostos aromáticos, resultando no aumento da capacidade de sintetizar seus derivados (álcool superior e éster). Para isso, utiliza-se de drogas análogas aos aminoácidos, p-fluoro-DL-fenilalanina (PFP), e 5,5,5-trifluoro-DL-leucina (TFL). (FUKUDA *et al.*, 1999; CASALONE *et al.*, 1997; VICENTE *et al.*, 2006; DUENÃS-SÁNCHEZ *et al.*, 2014; CORDENTE *et al.*, 2018).

Segundo YOSHIZAWA (1999), o caproato de etila representa um éster de extrema importância na composição aromática dos vinhos. Sua síntese, está vinculada com a capacidade da levedura em sintetizar lipídeos de cadeia curta (ácido caproico), através da atividade da ácido graxo sintetase. Esta enzima pode sofrer inibição pelo antifúngico Celulenina. Logo, a inoculação de cepas de leveduras em meio contendo cerulenina, pode ser utilizada como estratégia de seleção de cepas de *Saccharomyces ssp* com alto potencial de produção deste éster (YOSHIZAWA, 1999; TAMURA *et al.*, 2015; VICENTE *et al.*, 2006).

Pode-se dizer que um dos grupos de compostos com maior influência na depreciação dos aspectos sensoriais do vinho (*off-flavour*), são os compostos organosulfurados sintetizados pelas leveduras ao longo das reações metabólicas. O

sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), composto de maior destaque, foi identificado como um intermediário da via biossintética dos aminoácidos sulfurados, sendo facilmente detectados devido seu aroma característico de ovo estragado (HUANG *et al.*, 2017).

De acordo com Walker e Stewart (2016), dentre as características tecnológicas desejadas para as leveduras empregadas na produção de vinho, deseja-se que as linhagens inoculadas na fermentação alcóolica expressem boa capacidade metabólica das fontes de carbono que compõem o mosto de uva. No qual, segundo Crippen e Morrison (1986), em média, apresenta 18° BRIX como fonte de açúcares fermentescíveis, predominantemente como frutose e glicose, nas mesmas proporções (1:1).

Assim como as linhagens enológicas devem expressar alta capacidade de metabolizar as fontes de carbono predominantes do mosto de uva, é de fundamental importância a resistência às condições estressantes inerentes do processo de vinificação. Destaca-se às condições físico-químicas intrínsecas do mosto de uva, como o baixo pH (< 3,6), as temperaturas de processamento da fermentação situadas na faixa de 25 a 28°C para vinhos tintos, e de 12 a 18°C para brancos. Bem como os aspectos químicos de alta concentração de sólidos solúveis do mosto, fator de estresse osmótico acentuado na fase de latência da fermentação (Lag), e a alta concentração de etanol formados ao longo da fermentação. Além dos citados, as linhagens devem apresentar resistência ao sulfito (SO<sub>2</sub>), amplamente utilizado como antioxidante, e agente seletivo da ecologia microbiana do mosto. (JAKSON, 2018; RAINIERI, PRETORIUS, 2000). No Brasil, seu uso ao longo das etapas de vinificação, é regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 123, de 4 de novembro de 2016, que determina o

limite de 0,03 g/100mL ou 300ppm, na forma de dióxido de enxofre anidro sulfuroso, metabissulfito de potássio e bissulfito de potássio (BRASIL, 2016).

A seleção de linhagens de leveduras resistentes a fatores inerentes ao processo fermentativo, e que contribuam para o perfil aromático é de fundamental importância para a indústria de vinho moderna, de modo a obter produtos padronizados, e de qualidade. Nesse contexto, o objetivo geral deste estudo foi avaliar o potencial uso de leveduras isoladas de dornas de fermentação de cachaça, que de forma geral apresentam grande resistência a condições de estresse extremas e variação fenotípica das linhagens em função do processo, para a fabricação de vinhos. Fizeram parte dos critérios de triagem, fatores tecnológicos relacionados ao desempenho fermentativo, como a resistência a condições estressantes de processo similares aos parâmetros reais da fermentação do mosto de uva (químicas e físico-químicas), capacidade de fermentar diferentes fontes de carbono. Assim como a expressão de características metabólicas qualitativas, que contribuam para perfil sensorial. Outro fator tecnológico avaliado ao longo da seleção, está relacionado com a capacidade de floculação das linhagens (RAINIERI, PRETORIUS, 2000).

## **II. METODOLOGIA**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Escola de Farmácia – UFOP (LBCM/EF/UFOP). Para a seleção foram utilizadas a coleção LBCM (217), submetidas aos seguintes testes:

### **2.1 Placa Mãe**

As leveduras isoladas da coleção LBCM (217), foram incubadas em meio YP (1% extrato de levedura, 2% peptona), adicionado de 2% de glicose para

crescimento, por 48 h, em incubadora, a 200 rpm, 30 °C. Após este período, 200 µL de cada isolado foram transferidos para placa de 96 poços fundo chato, em triplicata recebendo o nome de placa mãe.

## **2.2 Crescimento em Diferentes Fontes de Carboidratos**

Para os testes de crescimento, as leveduras contidas na placa mãe foram inoculadas por meio do replicador de 96 pinos, em placas de 96 poços fundo chato, contendo meio YP com 2% de cada carboidrato (glicose, sacarose, frutose). Posteriormente foram incubadas a 30 °C por 48 h. O resultado do crescimento foi avaliado visualmente em grau de intensidade, em ótima (4), alta (3), média (2), baixa (1) e zero (0).

## **2.3 Testes de Sensibilidade às Condições de Estresse**

Para o teste de resistência às condições de estresse, as leveduras foram transferidas da placa mãe para as placas contendo os meios de teste. Os meios utilizados foram constituído por: YP com frutose (YPF), a 10, 15 e 20%; YPF 2% suplementado com etanol PA a 8, 12 e 16%; YPF 2% suplementado com metabissulfito de potássio 25, 50, e 75 ppm; YPF 2% com pH ajustado com ácido tartárico, em 2,0, 2,5, 3,0, 3,5 e 4,0. As transferências das leveduras para as placas com o meio teste foram feitas por replicador de 96 pinos. No teste de estresse térmico, as leveduras foram transferidas para microplacas contendo o meio de cultura YP com 2% de frutose, e incubadas a 18°C, 28°C e 37°C por 48 horas. Após, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C por um período de 48 horas. As leveduras que cresceram nesses poços foram consideradas resistentes ao estresse. O resultado foi avaliado visualmente em grau de intensidade de crescimento, em ótima (4), alta (3), média (2), baixa (1) e zero (0).

## **2.4 Teste de produção de H<sub>2</sub>S**

Para o teste de produção de sulfeto de hidrogênio, as leveduras foram transferidas da placa mãe, para as placas de Petri contendo meio ágar sulfito de bismuto (Acumedia®) por meio de replicador de 96 pinos, distribuído em triplicata. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C, por 72 h, e a intensidade de produção foi avaliada de acordo com a formação de halo preto, e a intensidade de coloração deste, em alta (3), média (2), baixa (1) e zero (0). Para controle positivo foi utilizado a levedura *Candida albicans* ATCC18804. (JIRANEK; LANGRIDGE; HENSCHKE, 1995 a; b).

## **2.5 Teste de resistência ao 5,5,5-trifluoro-DL-leucina (TFL)**

Os Pré-inóculos foram preparados em microplacas de 96 poços de fundo chato, contendo 200 µL de meio mínimo: 0,17% (YNB - DIFCO) sem aminoácido e sulfato de amônio, 0,5% de sulfato de amônio e, 2% de glicose. Em seguida, foram incubadas a por 30 °C, por 72h. Posteriormente, utilizando-se de replicador, os pré-inóculos foram transferidos para microplacas, contendo meio mínimo com 2% de glicose, suplementando com 0,5 mM de 5,5,5-trifluoro-DL-leucina (TFL) Sigma®, e incubadas a 30°C, por 72h. Os resultados foram avaliados em grau de intensidade de crescimento, em alta (3), média (2), baixa (1), e zero (0). Sendo consideradas resistentes as cepas que apresentarem crescimento (ASHIDA *et al.*, 1997).

## **2.6 Teste de resistência a Cerulenina**

O preparo dos pré-inóculos do teste de resistência a cerulenina seguiu o protocolo do teste de resistência ao TFL. Para o teste, foi utilizado o meio mínimo

(YNB 0,17% sem aminoácidos e sulfato de amônio, com 0,5% de sulfato de amônio e, 2 % de glicose), suplementado com 25 µM de cerulenina (Sigma®) e incubadas a 30 °C, por 72 h. Avaliação se deu pela intensidade de crescimento, em alta (3), média (2), baixa (1), e zero (0). (ARIKAWA *et al.*, 1991).

## **2.7 Pré-Seleção**

A partir da combinação dos resultados da seleção dos testes relacionados de produção de compostos aromáticos, resistência a condições estressantes, e baixa produção de sulfeto, foram pré-selecionadas dois conjuntos de cepas com potencial: Conjunto A, contendo as estirpes que apresentaram bom perfil de aromático e de resistência; Conto B, sendo as cepas selecionadas devido ao perfil de aromático exclusivamente. As leveduras pré selecionadas foram isoladas em meio sólido (YPD Ágar), e destinadas para as próximas etapas de seleção.

## **2.8 Teste qualitativo de floculação**

As leveduras foram inoculadas em tubos contendo 4 mL, de meio YP com 2% de frutose, e posteriormente incubadora a 30 °C, 200 rpm por 48 h. Após este período, as cepas foram homogeneizadas em vortex, à baixa rotação, por 5 segundos. A floculação foi avaliada visualmente após os tubos serem deixados em pé, em superfície plana em repouso, e o tempo cronometrado (120 minutos). Foram avaliadas em grau de intensidade de floculação em após repetição do procedimento em triplicata. As cepas utilizadas como controle foram as cepas LBCM 761 (Altamente floculante), e a Etanol Red (Não floculante).

## **2.9 Teste fermentativo em Tubos de Durham**

Os pré-inóculos foram crescidos em tubos com 3 mL de YP e 2% de Frutose (YPF 2%) em incubadora a 30 °C, 200 rpm, por 48 h. Após, 10 µL do pré-inóculo foi transferido para outro tubo com 4 ml de meio líquido YP com 2% de frutose. O microambiente foi fechado com tampa de rosca, contendo em seu interior 1 tubo de Durham invertido. Os tubos foram incubados a 30 °C de 48 a 72 h. Este procedimento foi realizado em triplicata, onde os resultados obtidos, deve-se a observação da turvação do meio e formação de gás evidenciado pelos espaços tomado no interior do tubo de Durham. Foi utilizado como controle negativo o meio sem inoculação (Branco). A avaliação se deu pela classificação em: (2) Alta, quando o tubo de Durham esteve com mais de um quarto do seu volume completo de gás, (1) regular quando o tubo esteve com menos de um quarto preenchido de ar, (-) ruim quando o tubo esteve totalmente preenchido pelo meio.

## **2.10 Teste fermentativo Tubos de Durham, adicionado de Antimicina**

O protocolo aplicado seguiu o do Teste Fermentativo em Tubos de Durhan, porém o meio YPF 2% foi suplementado com Antimicina - A (2 ppm). O critério de avaliação dos resultados foi o mesmo do teste fermentativo em tubos de Durham.

# **III. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

## **3.1 Capacidade de Metabolizar Frutose e Glicose**

A capacidade de crescimento das leveduras em diferentes fontes de carbono, foi avaliada e os resultados obtidos foram que das 217 cepas, 100% apresentaram crescimento em meio composto por 2% de frutose, dentre elas, 95% apresentaram ótima intensidade, e 5% alta intensidade. Quanto ao crescimento em sacarose e

glicose, foi possível verificar que as 217 cepas cresceram, com 100% apresentando intensidade de crescimento ótima.

Diferentemente da produção de cachaça onde os açúcares fermentescíveis majoritários são glicose e sacarose. Segundo Drumont *et al* (2008) o mosto de uva é composto majoritariamente por frutose e glicose, em média nas mesmas proporções. Se tratando de linhagens isoladas de dornas de fermentação de cachaça, as cepas que apresentaram intensidade crescimento ótima e alta nos meios contendo diferentes fontes de carbono (Frutose), representam o interesse do presente trabalho.

### 3.2 Resistência as Condições de Estresse

Em relação aos testes de sensibilidade frente às condições de estresse: osmótico o; baixo valor de pH; térmico (°C); SO<sub>2</sub> e tolerância ao etanol. Os resultados foram expressos na tabela 1 e 2, e os critérios adotados para os testes, foram apresentados no Apêndice 1, Figura 1.

**Tabela 1:** Resultado percentual dos testes de resistência às condições estressantes: Alta osmolaridade, concentração de etanol, sulfito, e diferentes temperaturas.

Intensidade de Crescimento		ÓTIMA (4)	ALTA (3)	MÉDIA (2)	BAIXA (1)	ZERO (0)
Frutose 10%	N° Cepas	34	181	1	1	0
	Percentual	15,67%	83,41%	0,46%	0,46%	0,00%
Frutose 15%	N° Cepas	26	187	3	0	1
	Percentual	11,98%	86,18%	1,38%	0,00%	0,46%
Frutose 20%	N° Cepas	26	183	7	1	0
	Percentual	11,98%	84,33%	3,23%	0,46%	0,00%
SO <sub>2</sub> : 25ppm	N° Cepas	210	2	2	2	1
	Percentual	96,77%	0,92%	0,92%	0,92%	0,46%
SO <sub>2</sub> : 50ppm	N° Cepas	208	8	1	0	0
	Percentual	95,85%	3,69%	0,46%	0,00%	0,00%
SO <sub>2</sub> : 75ppm	N° Cepas	176	25	4	3	9
	Percentual	81,11%	11,52%	1,84%	1,38%	4,15%
Etanol 8%	N° Cepas	166	46	2	3	0
	Percentual	76,50%	21,20%	0,92%	1,38%	0,00%

Etanol 10%	N° Cepas	76	79	25	26	12
	Percentual	35,02%	36,41%	11,52%	11,98%	5,53%
Etanol 16%	N° Cepas	33	12	17	26	129
	Percentual	15,21%	5,53%	7,83%	11,98%	59,45%
18°C	N° Cepas	210	6	1	0	0
	Percentual	96,77%	2,76%	0,46%	0,00%	0,00%
28°C	N° Cepas	206	11	0	0	0
	Percentual	94,93%	5,07%	0,00%	0,00%	0,00%
37°C	N° Cepas	200	15	2	0	0
	Percentual	92,17%	6,91%	0,92%	0,00%	0,00%

Fonte: Elaboração do Autor (2022)

**Tabela 2:** Resultado percentual do teste de resistência a diferentes valores de pH.

Intensidade de Crescimento		ALTA (3)	MÉDIA (2)	BAIXA (1)	ZERO (0)
pH: 2,0	N° Cepas	0	8	9	200
	Percentual	0,00%	3,69%	4,15%	92,17%
pH: 2,5	N° Cepas	148	23	5	41
	Percentual	68,20%	10,60%	2,30%	18,89%
pH: 3,0	N° Cepas	188	11	7	11
	Percentual	86,64%	5,07%	3,23%	5,07%
pH: 3,5	N° Cepas	194	10	3	10
	Percentual	89,40%	4,61%	1,38%	4,61%
pH: 4,0	N° Cepas	196	9	12	0
	Percentual	90,32%	4,15%	5,53%	0,00%

Fonte: Elaboração do Autor (2022)

De acordo como Rainieri e Pretorius (2000), apesar do mosto de uva possuir fatores nutricionais para o crescimento das leveduras, sua alta acidez média, atrelado a alta concentração de hexoses (alta osmolaridade) compondo o meio, são considerados fatores de estresse para as células, principalmente nas etapas iniciais da fermentação, denominada fase de latência (Lag). Segundo Heinisch e Rodicio (2017), passado a fase adaptativa (Lag), as células inoculadas iniciam denominada fase exponencial, metabolizando os açúcares em baixa pressão de oxigênio na qual preferencialmente a (Frutose:Glicose), e concomitantemente sintetizando de forma vigorosa principalmente o etanol e o dióxido de carbono, associado com a liberação

de energia na forma de calor, causando um aumento gradativo da temperatura do mosto. Portanto, o crescimento de cepas *Saccharomyces cerevisiae* em condições de estresse ácido, osmótico, de calor, e em concentrações de etanol similares as condições de fermentação do mosto de uva, se apresentam como uma etapa essencial de seleção das cepas com potencial enológico.

A alta concentração de açúcares do mosto de uva na etapa de inoculação, impõem às células microbianas a condição de alta osmolaridade, caracterizado pela perda da turgidez celular, resultante da fuga de água que compõem o meio intracelular, podendo representar grande impacto na viabilidade das células inoculadas, resultando na queda do desempenho fermentativo. Segundo Crippen e Morrison (1986), estima-se em média, através da determinação do teor sólidos solúveis (°BRIX), a concentração de 180 g/L (Frutose:Glicose). Atribuição feita, pois segundo Amerine e Ough (1976), os açúcares fermentescíveis compõem aproximadamente 90% dos sólidos solúveis totais (SST) da uva madura (WALKER, STEWART, 2016; HEINISH, RODICIO, 2017; MORENO-ARIBAS, POLO, 2009; CRIPPER, MORRISON, 1986).

Arelado a esta condição, o baixo valor de pH do mosto de uva no início da fermentação representa um importante estresse celular para as leveduras. Segundo Heinisch (2017), com o fluxo de H<sup>+</sup> para o meio intracelular, o meio citoplasmático sofre gradativa acidificação, fato que pode resultar a desnaturação de enzimas citosólicas, podendo causar apoptose celular a depender das condições. Portanto, cepas de *Saccharomyces cerevisiae* selecionadas para práticas enológicas, devem apresentar resistência ao crescimento em meios ácidos, visto o pH ótimo para

fermentação de vinhos tintos, e brancos estarem estabelecidos entre: (3,3 - 3,6), e (3,1 - 3,4), respectivamente (JACKSON, 2018)

Estudos desenvolvidos por Morgan e colaboradores (2019), com o objetivo de avaliar o impacto do sulfito em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* enológicas comerciais, demonstraram a importância da seleção das leveduras resistentes a concentrações de SO<sub>2</sub>. Nesse estudo, os resultados apontaram respostas diferentes das duas cepas avaliadas, frente a concentrações de 50 mg/l (ppm). Uma das cepas analisadas (QA23) apresentou maior sensibilidade, observada pelo retardo do crescimento populacional, assim como para atingir a etapa final da fermentação, evidenciada pelo esgotamento da fonte de carbono. O mecanismo de ação antimicrobiana, ocorre através do produto de dissociação dos sais, o SO<sub>2</sub> livre, que em contato com o vinho reage com a água, formando diferentes produtos. A depender do pH, o dióxido de enxofre pode estar na forma de sulfito molecular (SO<sub>2</sub>), íon bissulfito (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou sulfito ionizado (SO<sub>3</sub><sup>-</sup>). O sulfito molecular, bem como suas derivações inibem certas reações intracelulares dos microrganismos, hidrolisando enzimas e proteínas essenciais para o metabolismo celular dos microrganismos não resistentes (DIVAL *et al.*, 2012; ROTTER, 2011).

### **3.3 Sulfeto de Hidrogênio (H<sub>2</sub>S)**

Quanto a capacidade de produção de H<sub>2</sub>S pelas leveduras, os resultados encontrados mostraram que, entre as 217 cepas testadas, 39 não apresentaram produção de H<sub>2</sub>S, representando um percentual de aproximadamente 18%. Os resultados apontaram também diferença acerca da intensidade dentre o percentual (82%), que sintetizam certa quantidade de H<sub>2</sub>S. A classificação da capacidade de produção deste composto foi expressa no Apêndice 1, Figura 2.

De acordo com Jiranek, Langridge e Henschke (1996), o fator de maior influência para produção de sulfeto, está atrelado à baixa concentração de aminoácidos presente no mosto de uva durante a fermentação, resultando no desencadeamento de reações metabólicas, com objetivo de sintetizar e assim suprir os deficitários, cisteína e metionina (<20 mg/L), fundamentais para as funções vitais das leveduras. O “atalho metabólico” em questão, via biossintética de assimilação de sulfato (SAP) se traduz na redução do sulfato presente em grande quantidade no mosto (> 160 mg/L) em sulfeto, precursor dos aminoácidos sulfurados (RAUHUT, 2009; UGLIANO, HENSCHKEU, 2009; HUANG *et al.*, 2017).

### **3.4 Teste Relacionado a Produção de Compostos Aromáticos: TFL e Cerulenina**

Os testes de resistência às drogas TFL e cerulanina, são relacionados à potencial capacidade metabólica das leveduras em sintetizar compostos aromáticas, desejáveis para as características sensoriais das bebidas fermentadas. A escala utilizada para avaliação visual, foi baseada na intensidade de crescimento, evidenciada pela turvação do meio, como expresso no Apêndice 1, Figura 2.

Os resultados obtidos após a incubação das 217 cepas, em meio contendo cerulenina, foi de 127 cepas resistentes à droga (58,53%), dentre elas 87 (40,09%) e 15 (6,91%) cepas expressaram respectivamente, alta e média intensidade de crescimento. Quanto ao teste de resistência em meio adicionado de 5,5,5-trifluoro-DL-leucina (TFL), verificou-se o total de 133 cepas resistentes (61,23%), das quais 107 cepas apresentaram intensidade alta de crescimento (49,31%), e 11 cepas com média intensidade (5,07%).

As estirpes capazes de resistir ao meio contendo TFL, análogo ao aminoácido alifático Leucina, são caracterizadas pela insensibilidade à modulação alostérica frente ao produto final da via de biossíntese, sendo capazes de acumular este aminoácido, e logo apresentam alto potencial de produção de moléculas como: Álcool isoamil e seu éster isoamil acetato, responsáveis por notas frutadas e adocicadas (FUKUDA *et al.*, 1999; CASALONE *et al.*, 1997; VICENTE *et al.*, 2006; DUENÑAS-SÁNCHEZ *et al.*, 2014; CORDENTE *et al.*, 2018). Assim como a resistência das linhagens ao meio adicionado de cerulenina, esta característica está ligada com a atividade da ácido graxo sintetase, responsável pela síntese de ácido capróico, precursor do éster (caproato de etila) após reação com o etanol. O éster caproato de etila é caracterizado por contribuir com aromas frutado em bebidas fermentadas (YOSHIZAWA, 1999; TAMURA *et al.*, 2015; VICENTE *et al.*, 2006).

### **3.5 Pré-Seleção**

Cinco estirpes foram selecionadas no conjunto A (Tabela 3). Estas foram as que apresentaram intensidade de crescimento igual ou superior que três (3) em nas condições de estresse testadas, exceto em pH: 2,0, pois 92,27 % das estirpes não cresceram nesta condição extrema. Somado a este filtro, foi aplicado outra seleção, sobrepondo os resultados das análises relacionadas à produção de compostos aromáticos, selecionando as linhagens que apresentassem intensidade menor ou igual a um ( $\leq 1$ ) no teste de produção de H<sub>2</sub>S, e intensidade maior ou igual a três ( $\geq 3$ ) no teste de TFL e cerulenina.

**Tabela 3:** Cepas selecionadas baseado nas características fenotípicas relacionado a resistência as condições estressantes, e apresentem alto potencial de produção de compostos aromáticos foram expressas (Conjunto A). Selecionadas em função do potencial de produção de compostos aromáticos (Conjunto B).

SELEÇÃO	Conjunto A					Conjunto B		
	94	95	97	110	126	2	42	199
2 % Glicose	4	4	4	4	4	4	4	4
2% sacarose	4	4	4	4	4	4	4	4
2% Frutose	4	4	4	4	4	4	4	4
H <sub>2</sub> S	1	1	1	1	1	1	1	0
TFL	3	3	3	3	3	3	3	1
Cerulenina	3	3	3	3	3	0	3	3
10% Frutose	3	3	3	3	3	4	1	4
15% Frutose	3	3	3	3	3	3	4	4
20% Frutose	3	3	3	3	3	4	4	4
SO <sub>2</sub> 25ppm	4	4	4	4	4	4	4	4
SO <sub>2</sub> 50ppm	4	4	4	4	4	4	4	3
SO <sub>2</sub> 75ppm	4	4	4	4	4	4	4	0
8% Etanol	4	4	4	4	4	4	4	4
10% Etanol	3	4	4	4	4	4	4	4
16% Etanol	4	4	4	4	4	1	0	0
18°C	4	4	4	4	4	4	4	4
28°C	4	4	4	4	4	4	4	4
37°C	4	3	3	4	4	4	4	4
pH 2,5	3	3	3	3	3	3	3	3
pH 3,0	3	3	3	3	3	3	3	3
pH 3,5	3	3	3	3	3	3	3	3
pH 4,0	3	3	3	3	3	3	3	3

Fonte: Elaboração do Autor (2022)

Quando ao conjunto B, foram identificadas 3 cepas de interesse, Tabela 3. A seleção se baseou em critérios voltados para características qualitativas de fermentação, onde foram filtradas apenas as linhagens que apresentaram intensidade menor ou igual a um ( $\leq 1$ ) no teste relacionado a produção de H<sub>2</sub>S, bem como intensidade de crescimento maior ou igual a três ( $\geq 3$ ), em meio contendo TFL e cerulenina. Os resultados dos testes de resistência não foram avaliados para seleção deste conjunto. Após a definição da pré-seleção, as 8 cepas pertencentes ao conjunto A e conjunto B foram destinadas aos testes de floculação e fermentação, respectivamente.

### **3.6 Floculação**

Dentre as 8 cepas testadas quanto a sua capacidade floculativa (Apêndice 2, Tabela 4), nenhuma apresentou comportamento semelhante ao controle positivo (LBCM 761). Entretanto, as que apresentaram melhor desempenho foram as cepas 97, 110 e 126 interpretadas como moderadamente floculante (2). Já as cepas 94 e 95, apresentaram-se como pouco floculante (1), enquanto as cepas 2, 42, 199 não apresentaram nenhum tipo de sedimentação ao longo do período estipulado.

Segundo Varela e colaboradores (2020), de modo geral, cepas comerciais destinadas a vinificação não apresentam o fenótipo altamente floculante, em função do risco de promoverem uma fermentação arrastada, ou incompleta ao flocularem demasiadamente logo após a inoculação. Apesar da rápida separação natural da biomassa das leveduras representar um fator importante na redução de custos gerais da produção, no contexto de produção de vinhos, desejam-se linhagens de leveduras que apresentem robusta floculação somente após o término da fermentação alcoólica.

### **3.7 Potencial de Fermentação**

Quanto a capacidade fermentativa das leveduras, foram aplicados os testes presuntivos de fermentação em tubo de Durham, nos quais capacidade de fermentação da frutose foi avaliada de acordo com a intensidade de formação do dióxido de carbono. Por se tratar de organismos anaeróbios facultativos, é incorreto assumir que a formação de CO<sub>2</sub> é resultado da fermentação. Em decorrência disso, os resultados foram confrontados com o mesmo teste (YP 2% frutose), adicionado de Antimicina-A. Esta droga possui ação inibitória da respiração, atuando na cadeia transportadora de elétrons (mitocôndria), bloqueando o complexo 3, e impedindo assim a transferência de elétrons entre o citocromo B para o citocromo C (LODOLO

et al., 1998). Os resultados do teste foram expressos no Apêndice 2, Tabela 5, assim como critério de avaliação foi apresentado no Apêndice 1, Figura 3.

Por fim, as cepas selecionadas foram as que apresentaram maior vigor em relação ao desprendimento de gás resultantes da fermentação, em meio adicionado de Antimicina-A, foram: 110, 42, 94 e 199. O desempenho geral das 4 linhagens selecionadas ao final deste trabalho foram expressos no gráfico de barras no Apêndice 1, Figura 4.

#### **IV. CONCLUSÃO**

Diversos são os fatores que interferem na qualidade final dos vinhos, dentre eles, as características fenotípicas da levedura inoculada na etapa de fermentação alcoólica, representa um dos principais elementos. Diante disso, recentes estudos no campo da biotecnologia veem sendo desenvolvidos, com objetivo de identificar linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que contribuam para os aspectos sensoriais e tecnológicos, assim como elucidar os mecanismos envolvidos na expressão dessas características. Uma estratégia já consolidada, é por meio do isolamento e seleção de leveduras oriundas de diferentes processos biotecnológicos, expostas a condições de processo variadas, realizando a triagem das cepas que apresentem bom desempenho frente as condições de processo submetidas, baseadas nos parâmetros físico-químicas, químicos e físicos do processo a ser desenvolvido.

Dentre as 217 linhagens de levedura (LBCM) isoladas de dornas de fermentação de cachaça, oriundas de diversos alambiques do Brasil, 4 apresentaram-se com alto potencial biotecnológico para a produção de vinho tinto, são elas: 110, 42, 94 e 199. Essas, expressaram polivalência quanto a todas as condições de estresse intrínsecas à fermentação do mosto de uvas tintas, assim como bom desempenho nos

testes relacionados à produção de compostos aromáticos e, capacidade de fermentar frutose e glicose.

As cepas isoladas neste trabalho abrem caminho para a possibilidade da descoberta de linhagens de levedura da ecologia microbiana nacional, com potencial aplicação na produção de vinhos, ressaltando a vasta variação de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com potencial tecnológico inexplorado.

Como perspectiva, novos estudos como a fermentação em escala reduzida, determinação dos metabólitos primários e secundários pós fermentação e análise sensorial devem ser desenvolvidos, para que se amplie os dados sobre as linhagens selecionadas.

## V. REFERÊNCIAS

- Amerine, M. A., & Ough, C. S. (1976). Análisis de vinos y mostos. Acribia.
- Arikawa, Y., Yamada, M., Shimosaka, M., Okazaki, M., & Fukuzawa, M. (2000). Isolation of sake yeast mutants producing a high level of ethyl caproate and/or isoamyl acetate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(6), 675–677. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)90016-1](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)90016-1)
- Ashida, S., Ichikawa, E., Suginami, K., & Imayasu, S. (1987). Isolation and Application of Mutants Producing Sufficient Isoamyl Acetate, a Sake Flavor Component. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51(8), 2061–2065. <https://doi.org/10.1080/00021369.1987.10868367>
- Azevêdo, L. C. de, Reis, M. M., Silva, L. A. da, & Andrade, J. B. de. (2007). Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. *Química Nova*, 30, 1968–1975. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000800032>
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., & Kunkee, R. E. (1999). Principles and Practices of Winemaking. <http://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=3086832>

- BRASIL. (2014). Decreto 8.198, de 20 de fevereiro. Regulamenta a Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho. Diário Oficial
- BRASIL. (2016). RDC N°123, de 4 de novembro. Dispõe sobre os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em vinhos. Diário Oficial
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (2009). Instrução Normativa nº48, de 31 de agosto. Diário Oficial.
- Casalone, E., Fia, G., Barberio, C., Cavalieri, D., Turbanti, L., & Polsinelli, M. (1997a). Genetic and biochemical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to trifluoroleucine. *Research in Microbiology*, 148(7), 613–623. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(97\)88085-0](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(97)88085-0)
- Casalone, E., Fia, G., Barberio, C., Cavalieri, D., Turbanti, L., & Polsinelli, M. (1997b). Genetic and biochemical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to trifluoroleucine. *Research in Microbiology*, 148(7), 613–623. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(97\)88085-0](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(97)88085-0)
- Cordente, A. G., Solomon, M., Schulkin, A., Leigh Francis, I., Barker, A., Borneman, A. R., & Curtin, C. D. (2018). Novel wine yeast with ARO4 and TYR1 mutations that overproduce “floral” aroma compounds 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(14), 5977–5988. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9054-x>
- Crippen, D. D., & Morrison, J. C. (1986). The Effects of Sun Exposure on the Phenolic Content of Cabernet Sauvignon Berries During Development. Undefined. <https://www.semanticscholar.org/paper/The-Effects-of-Sun-Exposure-on-the-Phenolic-Content-Crippen-Morrison/a01e8d706e9da06d3e5143f98197393b295e8c77>
- De-la-Fuente-Blanco, A., Sáenz-Navajas, M.-P., & Ferreira, V. (2016). On the effects of higher alcohols on red wine aroma. *Food Chemistry*, 210, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.021>
- Divol, B., Du Toit, M., & Duckitt, E. (2012). Surviving in the presence of sulphur dioxide: Strategies developed by wine yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, 95, 601–613. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4186-x>
- Fukuda, K., Watanabe, M., & Asano, K. (1990). Altered Regulation of Aromatic Amino Acid Biosynthesis in  $\beta$ -Phenylethyl-alcohol-overproducing Mutants of Sake Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(12), 3151–3156. <https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10870488>
- Fukuda, K., Watanabe, M., Asano, K., Ouchi, K., & Takasawa, S. (1991). Isolation and genetic study of p-fluoro-dl-phenylalanine-resistant mutants overproducing  $\beta$ -phenethyl-alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 20(6), 449–452. <https://doi.org/10.1007/BF00334770>

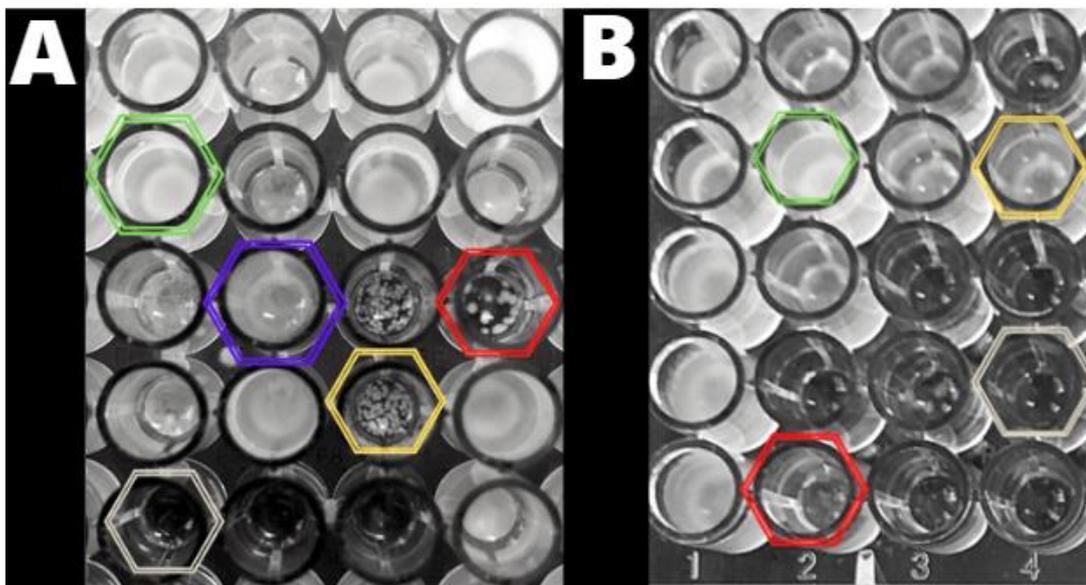
- Heinisch, J., & Rodicio, R. (2017). Stress Responses in Wine Yeast. Em *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (p. 377–395). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5_16)
- Huang, C.-W., Walker, M., Fedrizzi, B., Gardner, R., & Jiranek, V. (2017). Hydrogen sulfide and its roles in *Saccharomyces cerevisiae* in a winemaking context. *FEMS yeast research*, 17. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox058>
- Improved Winemaking: Sulphur Dioxide. ([s.d.]). Recuperado 5 de julho de 2022, de <http://www.brsquared.org/wine/Articles/SO2/SO2.htm>
- Jackson, R. S. (2008). *Wine Science: Principles and Applications*. Academic Press.
- Jiranek, V., Langridge, P., & Henschke, P. A. (1995a). Validation of bismuth-containing indicator media for predicting H<sub>2</sub>S-producing potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine under enological conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 269–273.
- Jiranek, V., Langridge, P., & Henschke, P. A. (1995b). Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 461–467. <https://doi.org/10.1128/aem.61.2.461-467.1995>
- Lodolo, E., O'Connor-Cox, E., & Axcell, B. (1999). Evidence of Antimycin-Insensitive Respiration in a Commercial Brewing Yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 105. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1999.tb00003.x>
- Moreno-Arribas, M. V., & Polo, C. (Orgs.). (2010). *Wine Chemistry and Biochemistry* (Softcover reprint of hardcover 1st ed. 2009 edição). Springer.
- Morgan, S. C., Haggerty, J. J., Johnston, B., Jiranek, V., & Durall, D. M. (2019). Response to Sulfur Dioxide Addition by Two Commercial *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Fermentation*, 5(3), 69. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030069>
- Rainieri, S., & Pretorius, I. (2000). Selection and improvement of wine yeast. *Annals of Microbiology*, 50.
- Rauhut, D. (2009). Usage and Formation of Sulphur Compounds. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, 181–207. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0_10)
- Rocha, S. M., Rodrigues, F., Coutinho, P., Delgadillo, I., & Coimbra, M. A. (2004). Volatile composition of Baga red wine: Assessment of the identification of the would-be impact odourants. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.10.009>
- Sumby, K. M., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*, 121(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.004>

- Tamura, H., Okada, H., Kume, K., Koyano, T., Goshima, T., Nakamura, R., Akao, T., Shimoi, H., Mizunuma, M., Ohya, Y., & Hirata, D. (2015). Isolation of a spontaneous cerulenin-resistant sake yeast with both high ethyl caproate-producing ability and normal checkpoint integrity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(7), 1191–1199. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1020756>
- Ugliano, M., & Henschke, P. (2009). Yeasts and Wine Flavour. Em *Wine chemistry and biochemistry* (p. 313–392). [https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5\\_17](https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5_17)
- Valentin, L. A. (2019). Chemical characterization of South American red wines [Text, Universidade de São Paulo]. <https://doi.org/10.11606/T.9.2019.tde-09122019-171707>
- Varela, C., Bartel, C., Nandorfy, D., Borneman, A., Schmidt, S., & Curtin, C. (2020). Identification of flocculant wine yeast strains with improved filtration-related phenotypes through application of high-throughput sedimentation rate assays. *Scientific Reports*, 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59579-y>
- Vicente, M. de A., Fietto, L. G., Castro, I. de M., dos Santos, A. N. G., Coutrim, M. X., & Brandão, R. L. (2006). Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higher levels of flavoring compounds for production of “cachaça” the Brazilian sugarcane spirit. *International Journal of Food Microbiology*, 108(1), 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.018>
- Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*, 2(4), 30. <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>
- Yoshizawa, K. (1999). Sake: Production and flavor. *Food Reviews International*, 15(1), 83–107. <https://doi.org/10.1080/87559129909541178>

## VI. APÊNDICE 1: INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

**Figura 1:** O lado A representa o critério de intensidade avaliado nos testes de resistência as condições de estresse: osmótico, térmico (°C), SO<sub>2</sub> e etanol, em placas de 96 wells (Lado A) o hexágono destacado em verde, representa as cepas que apresentaram ótima intensidade de crescimento (4). Em roxo, amarelo, vermelho, e branco foram interpretadas com intensidade de crescimento alta (3), média (2), baixa (1), sem crescimento (-), respectivamente. Quanto ao lado B, o hexágono destacado em verde, representa as cepas que apresentaram alta intensidade de

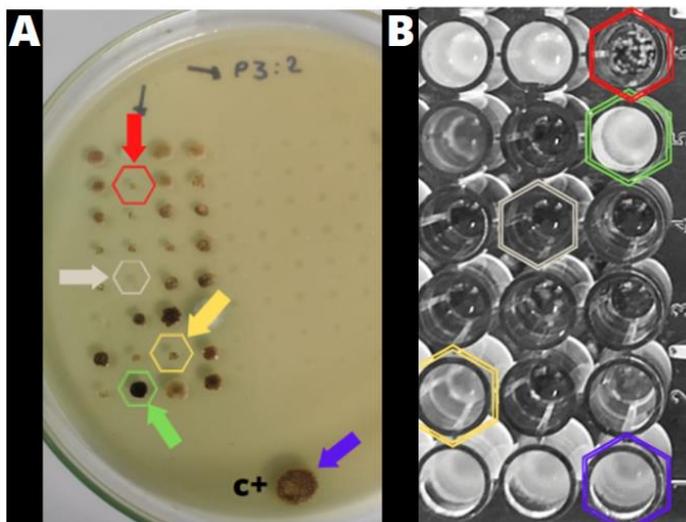
crescimento (3). Em amarelo, vermelho e branco, foram interpretadas com intensidade de crescimento média (2), e baixa (1), e sem crescimento (-), respectivamente. O lado B, é uma imagem do teste que representa a interpretação do teste de resistência a baixos valores de pH. o hexágono destacado em verde, representa as cepas que apresentaram alta intensidade de crescimento (3). Em amarelo, vermelho e branco, foram interpretadas com intensidade de crescimento média (2), e baixa (1), e sem crescimento (-), respectivamente.



Fonte: Elaboração do Autor (2022)

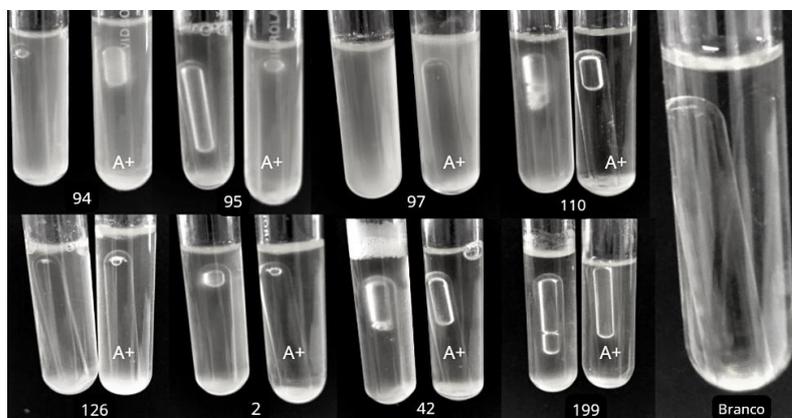
**Figura 2:** O lado A da Figura representa a interpretação do teste de produção de H<sub>2</sub>S em Placa de Petri. O hexágono destacado em verde, representa as cepas apresentaram alto de produção (3). Os inóculos destacas em amarelo, foram interpretadas como produtoras moderadas de H<sub>2</sub>S (1). Já as cepas assinaladas com a cor vermelha e branca, representam linhagens com baixa e não produtoras respectivamente. O Inóculo usado como controle positivo (*Candida albicans*), está destacada com a roxo. O lado B representa a interpretação do teste de com TFL e Cerulenina. o hexágono destacado em verde, representa as cepas que apresentaram ótima intensidade de crescimento (4). Os inóculos destacas em roxo, amarelo e vermelho, foram interpretadas com intensidade de

crescimento alta (3), média (2), baixa (1) respectivamente. Já os poços destacados em branco, apontam as cepas que não cresceram (-).



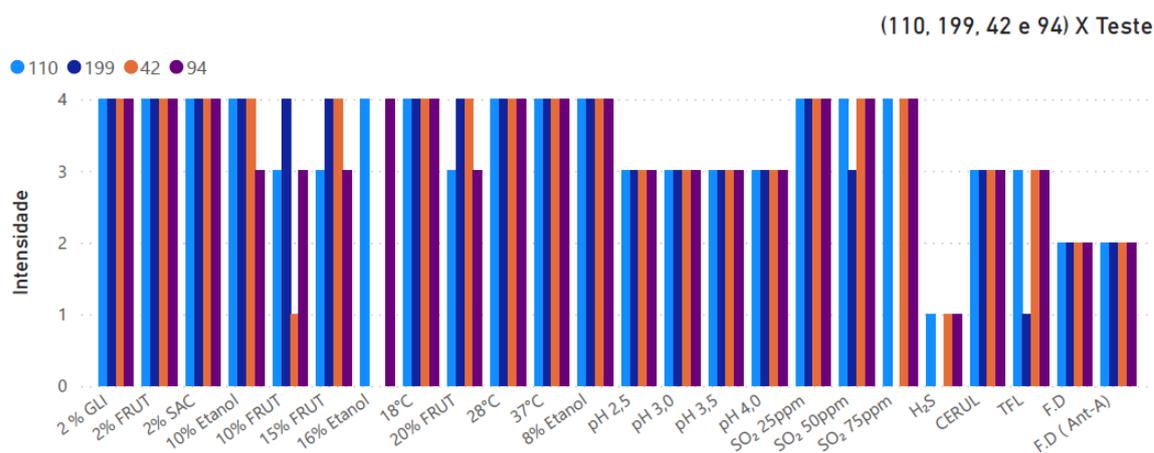
Fonte: Elaboração do Autor (2022)

Figura 3: Figura representativa dos testes de fermentação em tudo de Durham. Os tubos foram dispostos aos pares e apresentam a numeração da cepa inoculada. A letra A+ simboliza o mesmo inóculo, adicionado de Antimicina. O controle foi representado com o tudo sem inoculação de células.



Fonte: Elaboração do Autor (2022)

Figura 4: Gráfico de barra com os resultados das 4 cepas selecionadas (110, 199, 42 e 94), nos testes de resistência as condições de estresse testadas, testes relacionados a sínteses de aromáticos (TFL, Cerulenina e H<sub>2</sub>S), fermentação em tubo de Dulham.



Fonte: Elaboração do Autor (2022)

## VII. APÊNDICE 2: TABELA DOS RESULTADOS

Tabela 4: O quadro represente o resultado do teste qualitativo de floculação.

Cepa	Intensidade de Floculação
94	1
95	1
97	2
110	2
126	2
2	0
42	0
199	0
LBCM 761	4
E. RED	0

Fonte: Elaboração do Autor (2022)

Tabela 5: O quadro representa os resultados do teste de fermentação em tubos de Durham em YPF 2%, adicionado e não adicionado de Antimicina.

Cepa	YPF 2%	YPF 2% + Antimicina
94	2	2

95	2	1
97	<b>0</b>	<b>0</b>
110	2	2
126	1	1
2	1	1
42	2	2
199	2	2
Branco	<b>0</b>	<b>0</b>

**Fonte:** Elaboração do Autor (2022)

**Tabela 6:** O quadro representa os resultados dos testes de resistência ao estresse, produção de dióxido de enxofre, produção de compostos aromáticos, e fermentação em tubos de Durham adicionado e sem Antimicina-A.

Testes x Cepas	94	110	42	199
<b>2 % GLI</b>	4	4	4	4
<b>2% SAC</b>	4	4	4	4
<b>2% FRUT</b>	4	4	4	4
<b>H2S</b>	1	1	1	
<b>TFL</b>	3	3	3	1
<b>CERUL</b>	3	3	3	3
<b>10% FRUT</b>	3	3	1	4
<b>15% FRUT</b>	3	3	4	4
<b>20% FRUT</b>	3	3	4	4
<b>SO2 25ppm</b>	4	4	4	4
<b>SO2 50ppm</b>	4	4	4	3
<b>SO2 75ppm</b>	4	4	4	
<b>SO2 100ppm</b>	3	3	4	4
<b>8% Etanol</b>	4	4	4	4
<b>10% Etanol</b>	3	4	4	4
<b>16% Etanol</b>	4	4		
<b>18°C</b>	4	4	4	4
<b>28°C</b>	4	4	4	4
<b>37°C</b>	4	4	4	4
<b>pH 2,5</b>	3	3	3	3
<b>pH 3,0</b>	3	3	3	3
<b>pH 3,5</b>	3	3	3	3
<b>pH 4,0</b>	3	3	3	3
<b>Ferm.T. D</b>	2	2	2	2
<b>Ferm.T.D + ANT-A</b>	2	2	2	2

## VIII. APÊNDICE 3: REFERENCIAL TEÓRICO

### 8.1 Histórico

As evidências atualmente consideradas como a prova mais antiga do processo intencional de vinificação, envolvendo o cultivo de videiras (*Vitis vinifera*) é datado de aproximadamente 5.400 - 5.000 a.C. Entretanto, resíduos orgânicos relacionados com transformação química do mosto de uva em vinho, como ácido tartárico e seu sal tartarato de potássio encontrados na região denominada Oriente-Próximo (8.000 – 4.000 A.E.C), sugerem como primórdios da vitivinicultura, o período que se estende desde os primeiros milênios da era neolítica (10.000 – 3.000 A.E.C), acompanhado do surgimento da revolução agrícola. Já o primeiro registro de equipamentos utilizados e desenvolvidos exclusivamente para produção do vinho, possui datação de 4.100 a 4.000 A.E.C, localizado em uma caverna na região sul da Armênia. Somente milhares de anos depois, a vitivinicultura se espalharia para os demais continentes. (ESTREICHER, 2017).

No Brasil, as videiras (*Vitis vinifera*) foram introduzidas pela primeira vez junto a chegada das grandes navegações, no século XVI, onde hoje se situa o estado de São Paulo, antiga capitania de São Vicente. Entretanto, após a incidência de doenças fúngicas oriundas de uvas importadas da América Norte, a vinicultura colonial veio a decadência. Fato que resultou a substituição das castas europeias predominantemente cultivadas no período, por castas como: Isabel, Niágara e Seibel (*Vitis labrusca*). Somente no Século XX, através de investimentos governamentais, a região do Rio Grande do Sul voltou parcialmente com o cultivo de castas europeias, e

posteriormente expandindo o cultivar para outras regiões do sul e sudeste do país, macrorregião hoje denominada de viticultura tradicional (PROTAS et al., 2002).

O Brasil, diferentemente dos principais países produtores pertencentes ao “Velho Mundo” e “Novo Mundo” da vitivinicultura, devido sua dimensão continental, variação climática e geográfica, atualmente possui três macrorregiões produtoras de vinhos comerciais, com características distintas, em função das condições climáticas (temperado, subtropical, tropical, entre outros), técnica de manejo do vinhedo, altitude, e composição do solo (PEREIRA et al., 2020)

Segundo Giuliano e colaboradores (2020), a macrorregião denominada de produtora dos vinhos tradicionais, é considerada como a pioneira no setor da vitivinicultura nacional, caracterizada por sistemas de colheita e poda anual do vinhedo, regiões de clima temperado e subtropical (ambos úmidos), altitudes de 50 à 1.400m, compreendendo as regiões do estado do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná (tropical úmido), e localidades dos estados de São Paulo, Espírito Santo, e Minas Gerais (subtropical úmido). Já a viticultura tropical, referente aos sistemas de produção praticados nas regiões de clima tropical semiárido, como o Vale do Rio São Francisco, com destaque para os polos de Petrolina-PE/Juazeiro-BA, tem se desenvolvido desde os anos 70, inicialmente com foco no cultivo de uvas de mesa, e atualmente com produções de diversas variedades destinadas para elaboração de vinhos. Dentre as diferenças entre o sistema de produção tropical para o tradicional, pode-se destacar o uso de sistemas de irrigação nas regiões produtoras dos vinhos tropicais, possibilitando a vegetação das videiras todos os meses do ano, proporcionando ao produtor o controle do melhor período para execução da poda, e conseqüentemente da colheita, total ou parcial do vinhedo (PEREIRA et al., 2020).

A terceira macrorregião vitivinícola, produtora dos vinhos de inverno, vem sendo desenvolvida nas últimas décadas, através do desenvolvimento de novas tecnologias de manejo dos vinhedos. Este sistema compreende as produções de climas subtropical e tropical de altitude, com altitude média de oitocentos metros, sendo caracterizado pela técnica de manejo denominada de dupla poda, ou poda invertida, com dois ciclos vitícolas no ano, com uma colheita anual, no inverno (agosto), assim como na viticultura tradicional. Os “vinhos de inverno” teve suas primeiras produções nas regiões cafeeiras do Sul de Minas Gerais, Norte de São Paulo, e atualmente segue em expansão para outras regiões com clima tropical de altitude, como localidades pertencentes aos estados da Bahia (Chapada Diamantina, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Mato Grosso e Tocantins (PEREIRA et al. 2020; PROTAS et al., 2002).

De acordo com o último levantamento dos dados de 2019, a vitivinicultura brasileira compreende a área de 75.731 ha, onde aproximadamente 63% desta, está concentrada no Rio Grande do Sul. Em termos quantitativos, 90% da produção de vinho, e 85% dos espumantes nacionais advém do estado do Rio Grande do Sul. Entretanto com o avanço da tecnologia no campo da vitivinicultura, principalmente no manejo em climas subtropicais e tropicais de altitude, outras regiões ganharam espaço no cenário do vinho fino, como em regiões do Sul Minas Gerais. Fato que só foi possível, através de investimentos em pesquisas (IBGE, 2020; MELLO, MACHADO, 2020).

## **8.2 Legislação**

Tendo em vista a Instrução Normativa (IN) nº48, de 31 de agosto de 2018, entende-se por vinho fino, exclusivamente a bebida resultante da fermentação alcoólica do mosto de uva da variedade *Vitis vinifera*, onde o teor de álcool etílico deve

apresentar valores entre 8,6% (v/v) – 14% (v/v). Já para o Vinho de Mesa, entende-se o produto final oriundo da fermentação do mosto de uva simples sem restrição de espécie, com o mesmo intervalo de graduação alcoólica do vinho fino, podendo ser adoçado através da adição de mosto de uva simples, concentrado retificado ou sacarose sólida, assim como o vinho fino. Além da classificação de acordo com a concentração final de açúcares totais do produto, pode-se subdividir a bebida obtida pela fermentação do mosto de uva, em vinho tinto, branco e rose (MAPA, 2018).

### **8.3 Processo Produtivo**

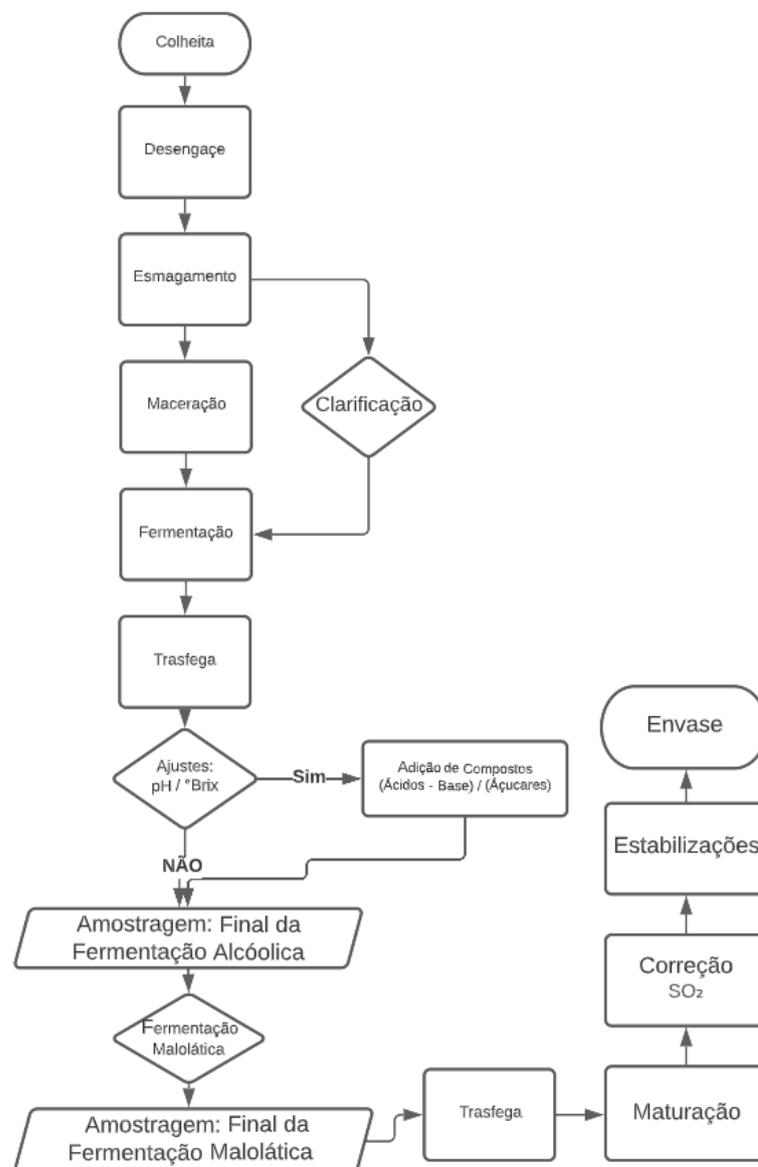
Como reflexo dos adventos científicos e tecnológicos, as práticas aplicadas no processo de vinificação sofreram diversas contribuições ao longo do tempo. A Figura 1 apresenta o fluxograma esquemático da produção de vinho tinto e branco.

#### **8.3.1 Colheita e Desengace**

Determinar o ponto ideal de colheita, é considerado um dos pontos críticos de controle do processo para obtenção do vinho. Na prática, o estágio de maturação é determinado a partir da avaliação dos parâmetros tecnológicos e sensoriais da uva. A maturação tecnológica deve ser determinada por meio de amostragem, no qual as bagas devem apresentar o valor desejado em relação à concentração de açúcar, (°BRIX), acidez total e pH. Entretanto, além do parâmetro citado acima, para se obter um produto com aspectos visuais, aromáticos e gustativos ideais, faz-se necessário a determinação da maturação fenólica. Esta, é estabelecida através da experimentação das uvas, ou por meio de modelos que identificam o potencial de proto-antocianinas e antocianinas presente nas bagas. Atualmente, o sistema de colheita pode ser realizado de forma automatizada, ou de forma manual (MÉLENDEZ et al, 2013; MORATA, 2019).

No recebimento, com intuito de garantir o estado sanitário, e impedir a oxidação de seus componentes, as uvas são armazenadas em ambientes refrigerados. A adição dos aditivos conservadores, nos limites estabelecidos pela legislação brasileira, também é uma técnica utilizada nos processos industriais. No recebimento, a aspersão de sulfito, combinado com a refrigeração, pode impedir o crescimento de agente biológicos indesejados, além de atuar com um antioxidante (JACKSON, 2018).

**Figura 4:** Processo de produção do vinho



**Fonte:** Elaboração do Autor (2022)

Na etapa seguinte, inicia-se o desengaço, que consiste na retirada do material vegetal adjacente às bagas de uva, como folhas e galhos (engaço). Em seguida, as uvas são esmagadas e mantidas juntamente com o mosto extraído para a maceração (no caso de vinho tinto). Em vinhos tintos, a etapa de maceração é fundamental para extração dos componentes que constituem o mesocarpo, endocarpo e pericarpo. Além da modificação física, a etapa de esmagamento, seguida da maceração, influencia diretamente a composição molecular do mosto, visto que a pressão exercida mecanicamente, leva a difusão de nutrientes, e ao rompimento das células vegetais, resultando na liberação e ativação de enzimas, capazes de sintetizar moléculas aromáticas e, ou hidrolisar macromoléculas, possibilitando a ação dos microrganismos nas etapas subsequentes. Em relação ao vinho tinto, o tempo de maceração deve ser calculado com base na sanidade da uva, idade da planta e característica de produto, para que as reações resultantes das interações ocorram de forma satisfatória (JACKSON, 2018).

Quando se destina a produção de vinhos compostos por aromas delicados, como os vinhos branco, em grande medida, industrialmente, adiciona-se a etapa de clarificação, antes do mosto receber o inóculo para a fermentação. Esta etapa se destina a precipitação dos sólidos dispersos no mosto (esteróis, lipídios, polifenóis e proteínas), impedindo assim a interação deste com os agentes biológicos, com objetivo de inibir a formação de metabólitos aromáticos indesejáveis. A clarificação que antecede a fermentação, normalmente é garantida pela técnica de decantação estática pelo frio (debouirage). Também pode-se empregar métodos dinâmicos, como centrifugação, filtração, bem como a adição de agentes precipitantes (COCITO, DELFINE, 1997).

### **8.3.2 Esmagamento e Maceração**

Pode-se dizer que a transformação dos compostos do mosto de uva no processo de vinificação, inicia a partir do momento que as uvas são esmagadas, na chamada fermentação espontânea. Ao serem esmagadas, estas levam consigo uma grande quantidade de leveduras e bactérias que naturalmente estão presentes na microbiota destas uvas. Esta biodiversidade varia de acordo com inúmeros fatores, como a casta (variedade) da uva, estágio de maturação da colheita, microclima da região de plantio e pré-tratamento antimicrobiano das uvas. Apesar da fermentação espontânea iniciar no momento do esmagamento, grande parte das práticas enológicas atuais, utilizam-se de inóculos de levedura com características conhecidas para um desenvolvimento fermentativo guiado. Onde, após a maceração, o mosto é transferido para um tanque, e a etapa é finalizada sem o contato com as bagas de uva (JACKSON, 2018; MORENO-ARIBAS, POLO, 2009).

### **8.3.3 Fermentação alcóolica**

De acordo com Lima e colaboradores (2001) a fermentação alcoólica pode ser dividida em três fases: fase Lag, exponencial e estacionária. Ao inocularmos as leveduras no mosto de uva, as células devem adaptar-se aos parâmetros do meio (físico-químicos e nutricionais), dando início à fase de latência ou Lag. Nesta fase, a metabolização das fontes de carbono é desviada majoritariamente para a respiração aeróbia, em função do maior saldo energético ao final das reações. Ao longo desta etapa, observa-se breve desprendimento de CO<sub>2</sub>, com ligeiro aumento da temperatura. Neste momento, deseja-se intenso crescimento populacional, para uma boa capacidade fermentativa na fase seguinte.

Ao início da fase exponencial, ou tumultuosa, pode-se evidenciar um vultuoso desprendimento de gás, formação de espuma, aumento gradativo da acidez e da

concentração de álcool etílico. Nesta fase, a concentração de oxigênio se encontra baixa, e o metabolismo é desviado para a via anaeróbia fermentativa, resultando intensa conversão dos açúcares em etanol, e dióxido de carbono, com a dissipação de calor. A temperatura deve ser controlada através de sistemas de trocadores de calor. Segundo Moreno-Aribas e Polo (2009), a fase exponencial pode demandar entre 3 a 6 horas. (VENTURINI FILHO, 2010; LIMA, et al 2001).

Na denominada fase estacionária, o teor de açúcares solúveis se encontra baixo, assim como a pressão de oxigênio, e os valores de pH, fato que resulta na estagnação do crescimento populacional, caracterizado pela manutenção do número de células viáveis no meio. Apesar do fato que a conversão das fontes de carbono em etanol não apresentar mais intensidade, a inda há atividade celular, com destaque a síntese de compostos secundários da fermentação. Ao final, deseja-se a depleção de fontes de carbono e alto rendimento alcóolico, e perfil aromático agradável. Esta etapa varia entre 2 a 10 dias. Posteriormente, a fase de declínio celular é iniciada, e a população de leveduras viáveis tende a praticamente zero, em resposta a baixa concentração dos fatores nutricionais, altas concentrações de etanol, e outros metabólitos que causam estresse celular extremo. (VENTURINI FILHO, 2010; LIMA, et al., 2001; MORENO-ARIBAS, POLO, 2009).

De acordo com Moreno-Aribas e Polo (2009), a fermentação alcóolica tem um rendimento energético menor comparado a respiração aeróbica. Ao final da via, cada molécula de glicose dará origem a duas moléculas de etanol, contabilizando um saldo de 2 ATP. Entretanto, a fermentação só pode ser processada por organismos com “aparatos genéticos” específicos. Já na respiração, após a degradação total da cadeia

carbônica, o saldo é de 32 ATP (JACKSON, 2018; MORENO-ARIBAS, POLO, 2009; STANIER et al., 1969).

#### **8.3.4 Fermentação Malolática**

Terminada a etapa de fermentação alcoólica, inicia-se a segunda fermentação. A fermentação malolática, pode ser expressa como a conversão do L-Ácido Málico, em L-Ácido Lático e Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>), catalisados por bactérias lácticas. De forma geral, os processos produtivos de vinhos tintos passam por esta etapa com objetivo de diminuir a acidez do vinho. Porém, os objetivos da fermentação malolática não se resumem apenas na desacidificação através do aumento do pH. Adicionado a este objetivo, podemos ressaltar o potencial de modificação do perfil aromático do vinho. Os compostos adicionados como fonte de SO<sub>2</sub> nas fases iniciais da vinificação, podem ser ajustados ao longo das etapas seguintes. Esta prática apresenta grande importância para as vinícolas industriais, principalmente quando as uvas não apresentam sanidade, pelo seu papel no controle da ecologia microbiana do mosto, e na ação antioxidante dos compostos do vinho. O atesto da concentração de SO<sub>2</sub> disponível no meio é essencial, pois sua concentração é reduzida ao longo do processo, devido a ligações com constituintes do mosto, como polifenóis, carbonilas e hexoses (LERM et al., 2010; JACKSON, 2018).

#### **8.3.5 Correções e estabilizações**

Após a determinação do final das fermentações, o vinho deve ser transferido, de forma que a borra resultante da precipitação de microrganismos, e outros constituintes do meio, sejam separados da solução que seguirá para a etapa de maturação e, ou clarificação e estabilização. Depois da trasfega, o mosto apresenta-se como uma solução coloidal, assim como uma suspensão coloidal. Os colóides presentes em solução no mosto fermentado, são moléculas que apresentam o tamanho de 1 e 1000

nm, onde os principais são, os compostos fenólicos, proteínas e polissacarídeos. As partículas suspensas, ou agregados coloidais em suspensão, diferentemente dos colóides, possuem tamanho superior a 1000 nm, e são formados por interações entre moléculas e macromoléculas, resíduos do tecido vegetal das bagas de uva e biomassa de microrganismos (KEMP et al, 2021; JACKSON, 2018).

Devido à instabilidade dos aspectos organolépticos, caracterizado pela turbidez do meio fermentado, na indústria, com objetivo de atingir os parâmetros desejados, caracterizado pelo alto brilho, baixa turbidez, alta estabilidade sensorial e físico-química, faz-se necessário que o fermentado de uva sofra as operações denominadas de clarificação e estabilização. Ambas as técnicas possuem grande importância se tratando de vinhos, pois juntas, contribuem para qualidade do vinho final. (KEMP et al, 2021; MORATA, 2019; JACKSON, 2018).

As técnicas de estabilização, tem como propósito garantir a estabilidade sensorial e microbiológica do vinho, desde a última etapa do processo produtivo, até o momento de consumo. As práticas de estabilização se baseiam na precipitação acelerada das partículas em suspensão, através da adição dos agentes ligantes, orgânicos ou inorgânico (bentonite, albumina, polivinilpolipirrolidona (PVPP), gelatina, entre outros). De forma que facilite a clarificação, por meio da filtração, ou sedimentação nos tanques, seguido da trasfega. Os principais componentes que se deseja mitigar com esta etapa, são precipitados proteicas, cristais de bitartarato de potássio e oxalato de cálcio, que ao longo do tempo tendem a formar precipitados no fundo das garrafas, influenciando negativamente na qualidade do vinho (MORATA, 2019; JACKSON, 2018).

## 8.4 REFERÊNCIAS

- Cocito, C., & Delfini, C. (1997). Experiments for developing selective clarification techniques: Sterol and fatty acid loss from grape must related to clarification technique. *Journal of Wine Research*, 8(3), 187–197. <https://doi.org/10.1080/09571269708718119>
- Estreicher, S. K. (2017). The beginning of wine and viticulture. *Physica Status Solidi c*, 14(7), 1700008. <https://doi.org/10.1002/pssc.201700008>
- Filho, V. G. W. (2010). *Bebidas alcoólicas ciência e tecnologia—2ª Edição*. Biblioteca Virtual. <https://www.bvirtual.com.br/NossoAcervo/Publicacao/158707>
- IBGE. (2020). *Levantamento Sistemático da Produção Agrícola*. <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>
- Jackson, R. S. (2008). *Wine Science: Principles and Applications*. Academic Press.
- Kemp, B., Marangon, M., Curioni, A., Waters, E., & Marchal, R. (2022). 8—New directions in stabilization, clarification, and fining. Em A. G. Reynolds (Org.), *Managing Wine Quality (Second Edition)* (p. 245–301). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102065-4.00002-X>
- Lerm, E., Engelbrecht, L., & Toit, M. du. (2010). Malolactic Fermentation: The ABC's of MLF. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31(2), 186–212. <https://doi.org/10.21548/31-2-1417>
- LIMA, U. de A. (2001). *Biotecnologia Industrial—Vol. 3* Editora Blucher—Issuu. [https://issuu.com/editorablucher/docs/issuu\\_-\\_biotecnologia\\_3](https://issuu.com/editorablucher/docs/issuu_-_biotecnologia_3)
- Meléndez, E., Ortiz, M. C., Sarabia, L. A., Íñiguez, M., & Puras, P. (2013). Modelling phenolic and technological maturities of grapes by means of the multivariate relation between organoleptic and physicochemical properties. *Analytica Chimica Acta*, 761, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.021>
- Mello, L. M. R. de, & MACHADO, C. A. E. (2020). *Vitivinicultura brasileira: Panorama*. <https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1124189/vitivinicultura-brasileira-panorama-2019>
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (2019). *Instrução Normativa nº48, de 31 de agosto*. Diário Oficial.
- Morata, A. (2019). *Red wine technology*.
- Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (Orgs.). (2009). *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5>
- PEREIRA, G. E., ONIETTO, J, ZANUS, M. C., SANTOS, H. P. dos, PROTAS, J. F. da S., & MELLO, L. M. R. de. (2020). *Vinhos no Brasil: Contrastes na Geografia e No Manejo das Videiras nas Três Viticulturas do País*.

<https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=1128174&biblioteca=vazio&busca=1128174&qFacets=1128174&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>

Protas, J. F. da S., Camargo, U. A., & Mello, L. M. R. de. (2017). A Viticultura brasileira: Realidade e perspectivas.  
<http://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/337020>

Stanier, R. Y., Doudoroff, M., & Adelberg E.A. (1969). Mundo dos Micróbios. Edgard Blucher Ltda.

## **RELEVÂNCIA DO TRABALHO**

O presente trabalho tem como relevância a possibilidade de fornecer ao setor da vitivinicultura, principalmente aos produtores do território nacional, uma alternativa viável para a produção de vinhos de qualidade, através da utilização de cepas genuinamente brasileiras que expressem contribuições em termos sensoriais, tal qual apresentem resistência as condições de processo de vinificação.

## **POTENTIAL USE OF ISOLATED YEAST FROM CACHAÇA FERMENTATION**

### **VATS FOR WINE PRODUCTION**

### **CACHAÇA'S YEASTS FOR WINE PRODUCTION**

## DECLARAÇÃO DE AUTORIA E RESPONSABILIDADE

Eu, Paulo Henrique Nolasco, Nolasco P. H. declaro, para fins de submissão à Revista Food Science Technology, que o artigo Potencial uso de leveduras isoladas de dornas de fermentação de cachaça para a fabricação de vinho, é original, inédito e não foi submetido a outro periódico, bem como expresse anuência acerca da submissão e da política editorial, diretrizes para publicação e declaração de direito autoral, que se aplicará em caso de publicação do trabalho supracitado. Declaro, também, na qualidade de autor do manuscrito "Potencial uso de leveduras isoladas de dornas de fermentação de cachaça para a fabricação de vinho", que participei da construção e formatação deste estudo, e assumo a responsabilidade pública pelo conteúdo deste. O trabalho conta com a contribuição do Prof. Dr. Aureliano Claret da Cunha, Cunha A. C. [aureliano.cunha@ufop.edu.br](mailto:aureliano.cunha@ufop.edu.br); Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão, Brandão R. L. [rbrand@ufop.edu.br](mailto:rbrand@ufop.edu.br); Profa. Dra. Izinara Rosse da Cruz, Rosse, I. [izinara.cruz@ufop.edu.br](mailto:izinara.cruz@ufop.edu.br); onde os mesmos contribuíram com a interpretação dos resultados, com a redação do texto, entre outros pontos fundamentais para realização e apresentação do trabalho.

---

Praça Juvenal Santos, nº 21, Bairro Pilar, CEP: 35400-000; Telefone: +551999862-2833; e-mail: [paulonolasco.ps@gmail.com](mailto:paulonolasco.ps@gmail.com)

Laboratório de Biologia Celular e Molecular - LBCM/ Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP. Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.