

**AVALIAÇÃO DE ESTRESSE E DO  
POTENCIAL FERMENTATIVO DE  
ISOLADOS DE *Saccharomyces* NA  
MICROVINIFICAÇÃO DA JABUTICABA**

**DÉBORA PEREIRA GUIMARÃES**

**2006**

**DÉBORA PEREIRA GUIMARÃES**

**AVALIAÇÃO DE ESTRESSE E DO POTENCIAL FERMENTATIVO DE  
ISOLADOS DE *Saccharomyces* NA MICROVINIFICAÇÃO DA  
JABUTICABA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Lavras como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola para a obtenção do título de “Mestre”.

**Orientadora**

**Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2006**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos  
da Biblioteca Central da UFLA**

Guimarães, Débora Pereira

Avaliação de estresse e do potencial fermentativo de isolados de  
*Saccharomyces* na microvinificação da jabuticaba / Débora Pereira  
Guimarães. -- Lavras : UFLA, 2006.

97 p. : il.

Orientadora: Rosane Freitas Schwan

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Saccharomyces*. 2. Estresse. 3. Fermentação. 4. Fermentado. 5. Jabuticaba. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-663.13

**DÉBORA PEREIRA GUIMARÃES**

**AVALIAÇÃO DE ESTRESSE E DO POTENCIAL FERMENTATIVO DE  
ISOLADOS DE *Saccharomyces* NA MICROVINIFICAÇÃO DA  
JABUTICABA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Lavras como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola para obtenção do título de “Mestre”.

**APROVADA em 31 de maio de 2006.**

**Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli**

**UFLA**

**Profa. Dra. Vany Perpétua Ferraz**

**UFMG**

**Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan**  
**UFLA**  
**(Orientadora)**

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS – BRASIL**  
**2006**

Aos meus pais,

**DEDICO!**

Caio,  
Bruno,  
João,

**OFEREÇO!**

## AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo: Deus.

Ao meu esposo, João Borges e aos nossos filhos, Caio e Bruno, pelo amor a mim dedicado.

A meus pais, Dilson e Dalva, pelo apoio e por compreenderem minha ausência.

A meus irmãos, Marco Aurélio e Paulo Rogério, por compreenderem minha ausência.

A meu carinhoso sobrinho Gabriel, irmã Jussara e cunhado Paulo, pelo apoio, conselhos e incentivo, nas horas que mais precisamos.

À cunhada Sônia e sobrinhos, por fazerem parte de minha família.

A minha sogra Maria, cunhada Dalva, cunhado Paulo e sobrinho Paulo Júnior, pelo carinho e apoio.

Aos queridos Sebastião, João, Djanira e Juercina, pelo carinho e apoio espiritual.

À professora Dra. Rosane Freitas Schwan, pela orientação, ensinamentos e profissionalismo, desde minha chegada à UFLA. Obrigada pela oportunidade para a realização de um dos meus sonhos.

Ao professor Dr. Eustáquio Souza Dias, pela acolhida, profissionalismo e ajuda.

À professora Dra. Vany Ferraz, pela disponibilidade, auxílio prestado nas análises de cromatografia gasosa e pela amizade.

Ao professor Dr. Romildo da Silva, pelos ensinamentos, amizade, disponibilidade e humildade.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do mestrado.

À Escola Agrotécnica Federal de Santa Teresa (EAFST), Santa Teresa, ES, minha instituição de ensino, pela política de qualificação profissional de seus servidores.

A todos os servidores da EAFST, que torceram pelo meu sucesso no mestrado.

Aos amigos da EAFST, “Lacy” e Márcia, “Chico” Daleprane e Marilene, Eduardo Ferreira e Ana Carla, Élio e Marita, e “Colombo”, pela amizade e incentivos.

Ao casal de Santa Teresa, Dr. Rogério e “Lolô”, pela amizade e apoio.

Ao ex-diretor e ao atual diretor da EAFST, professores Marcus Vinícius e Luís Marcari, por terem permitido minha saída para a realização do mestrado.

Ao casal amigo e colegas da EAFST, Márcio e Andressa, pelo apoio, amizade e convivência em Lavras.

Ao cabo Nery e família, pela amizade, apoio e convivência em Lavras.

À amiga Márcia M. Tomizawa, pela amizade, companheirismo e convivência em Lavras.

À amiga Soraia, pela amizade, carinho e presença nas horas mais necessárias.

A Ivani, amiga incansável de todas as horas. A amiga Cidinha, pelo carinho, atenção e ajuda. A amiga Magda, pelo sorriso atencioso e vontade de sempre ajudar. As funcionárias da Ciência dos Alimentos, Creuza, Sandra e Tina, pela amizade, disponibilidade e profissionalismo.

Aos colegas e ex-colegas de pós-graduação no DBI: João Borges, Aramália, Fernanda, Míriam, Márcio, Ana Lúcia, Nina, Evânia, “Val”, Carla, Félix, Euziclei, Gisele, Thaís, Sandra, Rômulo e Patrícia.

Aos alunos bolsistas de iniciação científica e estagiários do Laboratório de Microbiologia (ordem alfabética): Ana Paula, Caio, Claudinha, Daniella,

Emerson, Gabriela, Luziane, Milena, Patrícia, Plínio e Whasley, pelo convívio e amizade.

Aos amigos Rosane e Disney, Eustáquio e Cidinha, e todos os membros da Igreja Maranata de Lavras, pelo apoio, solidariedade e amizade.

Aos amigos Luciano e Miriam.

Aos amigos Júlio e Rafaela.

A amiga Viviane Matiello, pela contribuição e ajuda prestada.

A vizinha Penha, pela amizade e ajuda.

Aos funcionários do DBI/UFLA, Lamartine, Irondina, Rafaela e Zélia.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos, a minha gratidão!



## **BIOGRAFIA**

**DÉBORA PEREIRA GUIMARÃES**, filha de Dylson Botelho Pereira e Dalva Garcia Pereira, nasceu em Carangola, MG. Casada com João Borges Guimarães e mãe de Bruno Pereira Guimarães e de Caio Pereira Guimarães.

Licenciada em Biologia pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, em julho de 1985. Professora efetiva concursada do estado de Minas Gerais (1986), atuando em Viçosa e Patos de Minas, lecionando Ciências e Biologia.

Especialista (lato-sensu) em Supervisão Escolar pela Universidade Salgado de Oliveira, São Gonçalo, RJ (1996) e em Biologia pela Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG (1999). Em dezembro de 1994, tornou-se professora efetiva da rede federal, por concurso público realizado pelo MEC/Escola Agrotécnica Federal de São João Evangelista, MG. Há 11 anos transferiu-se para a Escola Agrotécnica Federal de Santa Teresa, Santa Teresa, ES, lecionando Biologia e Microbiologia.

Mestre em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Lavras, com dissertação defendida em maio de 2006.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO GERAL.....	i
GENERAL ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	01
1 Introdução geral.....	02
2 Referencial teórico.....	04
2.1 Jaboticaba.....	04
2.2 Fermentado de frutas.....	05
2.3 Fermentação alcoólica.....	06
2.4 Produtos primários e secundários da fermentação.....	08
2.5 Importantes metabólitos provenientes do processo fermentativo.....	09
2.5.1 Etanol.....	11
2.5.2 Glicerol.....	11
2.5.3 Álcoois superiores.....	12
2.5.4 Ácidos orgânicos.....	13
2.5.5 Ésteres.....	14
2.5.6 Aldeídos.....	15
2.5.7 Cetonas.....	16
2.5.8 Metanol.....	16
2.6 Estresses em ambiente fermentativo.....	17
2.7 Estresse osmótico.....	19
2.8 Estresse etanólico.....	20
2.9 Estresse oxidativo.....	21
2.10 Defesas antioxidantes em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	22
2.11 Respostas adaptativas ao estresse em leveduras.....	25
3 Referências bibliográficas.....	27

CAPÍTULO 2 – Resistência aos estresses oxidativo, etanólico e osmótico, por isolados de <i>Saccharomyces</i> .....	37
1 Resumo.....	38
2 Abstract.....	39
3 Introdução.....	40
4 Material e métodos.....	42
4.1 Leveduras.....	42
4.2 Preparo da cultura estoque e condições de crescimento celular.....	43
4.3 Preparo do inóculo.....	43
4.4 Promoção do estresse oxidativo.....	43
4.5 Promoção do estresse alcoólico.....	44
4.6 Promoção do estresse osmótico .....	45
4.7 Viabilidade celular.....	46
4.8 Análise estatística.....	46
5 Resultados e discussão.....	47
5.1 Resistência ao estresse oxidativo.....	47
5.2 Resistência ao estresse etanólico.....	50
5.3 Resistência ao estresse osmótico.....	54
6 Conclusões.....	58
7 Referências bibliográficas.....	59
CAPÍTULO 3 – Potencial fermentativo de treze isolados <i>Saccharomyces</i> na microvinificação da jaboticaba ( <i>Myrciaria jaboticaba</i> ).....	61
1 Resumo.....	62
2 Abstract.....	63
3 Introdução.....	64
4 Material e métodos.....	66
4.1 Leveduras.....	66
4.2 Condições de crescimento das leveduras.....	66

4.3 Coleta das frutas .....	66
4.4 Preparo do mosto para a fermentação.....	67
4.5 Padronização do inóculo e sua adaptação.....	67
4.6 Inoculação dos frascos para fermentação.....	67
4.7 Amostragem.....	68
4.8 Análises químicas e físicas.....	68
4.8.1 Determinação de proteína, umidade, extrato etéreo e cinzas.....	69
4.8.2 Análises cromatográficas: CG e HPLC.....	70
5 Resultados e discussão.....	72
5.1 Proteína, umidade, extrato etéreo e cinzas da jabuticaba.....	72
5.2 Açúcares totais, açúcares redutores e açúcares não redutores.....	79
6 Conclusões.....	94
7 Referências bibliográficas.....	95

## RESUMO GERAL

GUIMARÃES, Débora Pereira. **Avaliação de estresse e do potencial fermentativo de isolados de *Saccharomyces* na microvinificação da jaboticaba**. Lavras: UFLA. 2006. 97p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)\*.

Linhagens de levedura *Saccharomyces* são os principais agentes responsáveis pela fermentação alcoólica. Essas leveduras adaptadas às condições do mosto (fermentativas) ou em vias de adaptação (do laboratório) podem se desenvolver sob vários desafios estressantes durante a vinificação. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o comportamento de treze isolados *Saccharomyces* submetidos aos estresses osmóticos, oxidativo e etanólico e também avaliar a performance desses isolados, durante a microvinificação da jaboticaba. As leveduras CA 1162, CA 1186, VR-1, PE-2, SA-1 e BG foram menos resistentes ao estresse oxidativo, na fase exponencial. Após atingir a fase estacionária, as leveduras foram mais resistentes à atividade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os isolados CA 116, CA 1186 e SA-1 foram capazes de crescer e tolerar concentrações de 10% e 12% de etanol, adicionado ao meio de cultura. Os estresses osmóticos foram realizados com a adição de KCl 0,7M e 1,0M e as linhagens CA 1187, CA 1183, CAT-1, VR-1, SA-1 e BG apresentaram resistências a ambas as concentrações de KCl. Os 13 isolados foram capazes de fermentar o mosto de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*). As fermentações mais rápidas ocorreram com as cepas CA 1186 e CA 1187, que terminaram a fermentação em 72 horas. A maior concentração de ácido orgânico encontrada foi do ácido cítrico com 1,39g.100mL<sup>-1</sup>. O composto volátil majoritário foi o etanol, na concentração de 10,07% (v/v), obtido com a linhagem CA 1162.

---

\*Orientadora: Professora Dra. Rosane Freitas Schwan - UFLA .

## GENERAL ABSTRACT

GUIMARÃES, Débora Pereira. **Evaluation of stress and of the fermentative potential of *Saccharomyces* isolates in the jaboticaba microvinification.** Lavras: UFLA. 2006. 97 p. Dissertation (Master in Agricultural Microbiology)\*.

Strains of *Saccharomyces* yeast are the main agents responsible for alcoholic fermentation. Those yeasts adapted to the conditions of the must (fermentative) or to be about to adapting (laboratory ones) can develop under a number of stressing challenges during vinification. The objectives of this work were to evaluate the behavior of thirteen isolates *Saccharomyces* submitted to the osmotic, oxidative and ethanol stresses and also to evaluate the performance of those isolates during jaboticaba microvinification. The yeasts CA 1162, CA 1186, VR-1, PE-2, SA-1 and BG were less resistant to oxidative stress in the exponential, but in the stationary phase all showed a marked resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. After they had reached the stationary phase, the yeasts were more resistant to the activity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The isolates CA 116, CA 1186 and SA-1 were able to grow and tolerate concentrations of 10% and 12% of ethanol added to the culture medium. The stresses osmotic were performed with addition of KCl 0.7 M and KCl 1.0 M and the strains CA 1187, CA 1183, CAT-1, VR-1, SA-1 and BG showed resistance to both concentrations of KCl. The thirteen isolates were capable of fermenting the must. The fastest fermentations occurred with CA 1186 and CA 1187 strains, which managed to ended the fermentation in 72 hours. The highest concentration of organic acid found was that of citric acid with 1.39g.100mL<sup>-1</sup>; and the major volatile compound was ethanol at the concentration of 10.07% (v/v) produced by strain CA 1162.

---

\*Adviser: Professor Dr. Rosane Freitas Schwan – UFLA.

## **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

As bebidas fermentadas apresentam-se como alternativas no desenvolvimento de tecnologias para a obtenção de produtos derivados com maior período de vida útil e maior valor agregado (Muniz et al., 2002). As bebidas fermentadas, de frutas, constituem produtos promissores, devido à tendência de aceitação em pesquisas de consumo, além de contribuírem para a redução de perdas pós-colheita de frutos perecíveis (Sandhu & Joshi, 1995).

A jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) é um fruto que pode fornecer ao consumidor vários produtos de qualidade, como geléia, licor e também o fermentado alcoólico. Na elaboração do vinho, a transformação do açúcar do mosto em álcool ocorre pela ação metabólica das leveduras, entretanto, o rendimento e a velocidade do processo dependem, entre outros fatores, da linhagem de levedura empregada.

Os microrganismos são fundamentais no processo de vinificação. Para entender a sua contribuição, é necessário conhecer a identificação taxonômica, o seu comportamento e a cinética de crescimento de cada espécie associada ao processo. A influência das práticas de vinificação sobre o crescimento e a atividade dos microrganismos pode afetar a qualidade sensorial e a aceitabilidade das bebidas fermentadas (Fleet, 1997).

As diferenças entre vinhos obtidos a partir de um mesmo mosto, fermentados por distintas leveduras, em condições idênticas, devem ser atribuídas aos produtos secundários formados durante a fermentação alcoólica. As leveduras mais alcoolígenas, principalmente da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, produzem os teores mais elevados de álcoois superiores e ésteres, porém, suas concentrações relativas são variáveis em função das linhagens que podem imprimir um caráter particular ao aroma de diferentes vinhos (Silva & Silva, 1987).



Importantes variabilidades no metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* têm sido descritas e numerosos estudos mostraram que a escolha da linhagem para conduzir o processo fermentativo pode determinar a qualidade do produto final (Longo et al., 1992).

As células de leveduras, durante o processo fermentativo, são submetidas a uma variedade de pressões, como biológicas, químicas e físicas, usualmente conhecidas por estresse (Pataro et al., 1998). A habilidade para conduzir a vinificação é largamente influenciada pela resposta das células de leveduras a estas condições de estresse que as afetam durante a produção de vinho (Carrasco et al., 2001).

No panorama brasileiro de fabricação de bebidas fermentadas de jabuticaba, prevalece uma produção empírica e caseira. Por isso, estudos a respeito da capacidade fermentativa e de tolerância ao estresse de isolados de *Saccharomyces cerevisiae* possibilitam o controle do processo fermentativo e da qualidade do produto, pela existência de um padrão tecnológico. Em vista dessas considerações, o presente trabalho teve como objetivos:

1. avaliar o comportamento de 13 isolados de *Saccharomyces* submetidos aos estresses: osmótico, oxidativo e etanólico;
2. avaliar a performance desses isolados de *Saccharomyces* durante a microvinificação da jabuticaba.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Jaboticaba

A jaboticaba é nativa do Brasil, originária da região centro-sul, podendo ser encontrada desde o estado do Pará até o Rio Grande do Sul, mas, é nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo que ocorrem as maiores produções. Dentre as espécies conhecidas, destacam-se a *Myrciaria cauliflora* (DC) Berg (jaboticaba paulista, jaboticaba-açu) e a *Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg (jaboticaba-sabará) que produzem frutos apropriados tanto para a indústria como para consumo “in natura”, devido às suas características (Donadio, 1983; Matos, 1983).

As jaboticabeiras pertencem à família Myrtaceae (Donadio, 2000), são árvores de tamanho médio, de copa globosa, com fruto do tipo baga, de coloração roxa escura, com polpa esbranquiçada, doce, envolvendo de 1 a 4 sementes (Soares et al., 2001). A jaboticabeira-sabará produz frutos classificados como bacilo globoso de 20 a 30mm de diâmetro, com polpa macia, esbranquiçada, suculenta e de sabor subácido (Magalhães et al., 1996).

Segundo Donadio (2000), apesar de ainda ser considerada uma fruta de pomares domésticos, a jaboticaba vem sendo comercializada na capital de São Paulo, em cidades do interior daquele estado, bem como no interior de Minas Gerais e Paraná. Dados obtidos dos boletins Ceagesp, do ano de 2002, atestam sua comercialização. Naquele ano, de acordo com a Ceagesp, foram comercializadas 2.250.000kg de jaboticaba (disponível em: <[http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra\\_conteudo.asp?conteudo=4508](http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=4508)> acesso em 07/05/2006). Soares et al. (2001) afirmam que esta fruta é muito apreciada para a fabricação de geléias, vinhos e licores caseiros.

## **2.2 Fermentado de frutas**

Segundo o Ministério da Agricultura, pelo Decreto nº 2.314 de 04/09/1997, o fermentado de frutas é a bebida com graduação alcoólica de quatro a quatorze por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida da fermentação alcoólica do mosto de fruta sã, fresca e madura (Brasil, 1997). A denominação “vinho” é reservada para a bebida proveniente de uva, sendo vedada sua utilização para produtos obtidos de outras matérias-primas, de acordo com a Lei nº 7.678 (Brasil, 1988).

Prudêncio (1969) menciona que, teoricamente, qualquer fruto ou vegetal comestível, que contenha umidade suficiente, açúcar e outros nutrientes para as leveduras, pode servir como matéria-prima para a produção de bebidas alcoólicas.

Diversos têm sido os frutos utilizados para a produção de bebidas fermentadas. Tradicionalmente, são empregadas uvas e maçãs na obtenção de bebidas fermentadas. Muitos países, principalmente os europeus, produzem vinhos de frutas pelos mesmos processos de fabricação, sendo a maçã, a pêra, a groselha, a framboesa e a cereja as mais utilizadas (Muniz et al., 2002). Dias et al. (2001) mencionaram que a biotecnologia dos processos fermentativos, principalmente os desenvolvidos para a produção de vinhos, pode ser usada, analogamente, para a elaboração de fermentados de frutas. Nos países tropicais, frutas como laranja, goiaba, abricó, abacaxi, manga (Sandhu & Joshi, 1995), caju (Abreu, 2001), cajá (Dias et al., 2003), banana (Arruda et al., 2003) e kiwi (Soufleros et al., 2001) fornecem fermentados bastante apreciados e saborosos.

Segundo Amaral (2004), ainda não se tem conhecimento do registro de bebida fermentada, proveniente de jabuticaba, com controle durante a sua elaboração e que uma definição tanto de cepas de leveduras apropriadas para a fermentação, quanto do processo fermentativo, seria de extrema importância para evitar desperdícios da fruta, gerar lucros e valorizar a fruticultura do nosso

país. Tal processo com controle de qualidade ainda não é verificado nos dias atuais.

### **2.3 Fermentação alcoólica**

A fermentação alcoólica é uma das principais fases durante a produção de vinho, sendo, na maioria das vezes, conduzida por leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (Ivorra et al., 1999). Essa fermentação é um processo de catabolismo anaeróbico de compostos orgânicos presentes no substrato e gerador de energia (Stanbury et al., 1995).

O processo fermentativo tem início com a oxidação da glicose a ácido pirúvico por meio de da via Embden-Meyerhof, em que enzimas glicolíticas catalisam a quebra da glicose em dois açúcares de três carbonos. Estes açúcares são convertidos por oxidação, a duas moléculas de piruvato por meio de 10 reações catalisadas por diferentes enzimas (Tortora, 2002).

Nos organismos capazes de realizar fermentação alcoólica, o piruvato perde dióxido de carbono produzindo acetaldeído, sendo reduzido a etanol (Campbell, 2003). As leveduras são os microrganismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa (Lima et al., 2001) e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o principal microrganismo utilizado na produção de bebidas alcoólicas (Reed & Nagodawithana, 1991), devido à sua atividade álcool desidrogenase (ADH) (Okamura-Matsui et al., 2003).

*Saccharomyces cerevisiae* produz, além de etanol e gás carbônico, outros produtos da fermentação alcoólica, como acetaldeído, glicerol, 2,3 butilenoglicol, ácido lático, ácido succínico, ácido cítrico, ésteres e, em pequenas proporções, álcoois superiores e ácidos carboxílicos (Hashizume, 2001).

O etanol e o dióxido de carbono produzidos pelas leveduras, durante o processo fermentativo, são produtos de excreção, sem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose. O objetivo metabólico da levedura é gerar uma forma de energia, como adenosina trifosfato (ATP), que será empregada na realização de diversas atividades fisiológicas, como absorção e excreção, dentre outros e biossínteses necessárias à manutenção da vida, crescimento e multiplicação, perpetuando, assim, sua espécie (Lima et al., 2001).

Durante o processo fermentativo, do mosto de fruta, pode-se observar uma fase tumultuosa ou fase de fermentação vigorosa, caracterizada por desprendimento de dióxido de carbono e aumento da temperatura. Nesta fase, as taxas de glicólise são altas (Kunkee & Bisson, 1993) e novas substâncias são produzidas como álcool etílico, que aparece em maior quantidade (Rosier, 1995). Segundo Kunkee & Bisson (1993), a existência de uma fase lenta da fermentação, com diminuição da liberação de gás carbônico, é marcada pela reduzida efervescência.

O processo fermentativo sofre interferência de diversos fatores, como físicos, químicos e microbiológicos. Esses fatores afetam o rendimento fermentativo, levando à maior formação de produtos secundários e biomassa (Lima et al., 2001). Segundo Fleet & Heard (1993), a temperatura constitui um dos mais importantes parâmetros para o desenvolvimento da fermentação alcoólica, podendo afetar a cinética do processo, em termos de duração e taxa de fermentação, bem como a qualidade final do vinho, isto é, a produção de metabólitos secundários. Vinhos produzidos a baixas temperaturas (10°C a 15°C) são conhecidos por desenvolver características peculiares de gosto e aroma (Feuillat et al., 1997) e, quando associadas a uma lenta taxa de fermentação, favorecem a retenção de compostos voláteis desejáveis (Flett, 1997). Outra interferência é a formação de flocos de leveduras e conseqüente sedimentação das mesmas, ficando menos disponíveis para o consumo dos

açúcares do mosto. A floculação dificulta a conversão do açúcar em etanol porque, para uma máxima conversão de açúcar em etanol e CO<sub>2</sub>, é essencial que as leveduras permaneçam suspensas no líquido de fermentação e não floculadas (Rose, 1980).

Durante o processo fermentativo, a proliferação de espécies de leveduras reflete na qualidade organoléptica do vinho, devido à produção de diferentes concentrações de alguns compostos, como glicerol, ésteres, acetoina e álcoois superiores (Romano et al., 1996). Assim, na ausência de oxigênio, o metabolismo celular de leveduras pode ser alterado deslocando o processo fermentativo em favor da produção de compostos do aroma (Valero et al., 2002). As principais substâncias presentes no aroma dos vinhos são formadas durante a fermentação de leveduras (Stashenko et al., 1992). Segundo Riponi et al. (1997), a grande diferença na produção de compostos voláteis é devido às espécies de leveduras e, dentro de cada espécie, às diferentes linhagens

#### **2.4 Produtos primários e secundários da fermentação**

Durante a fermentação para a produção de bebidas alcoólicas, leveduras rendem não somente etanol, como principal produto, mas também uma variedade de produtos secundários que contribuem significativamente para as propriedades sensoriais dos vinhos (Lambrechts & Pretorius, 2000). Essa possibilidade surge devido à presença de rotas metabólicas alternativas, àquela da produção de etanol. Propicia a formação de produtos relacionados, direta ou indiretamente, com a adaptação, a sobrevivência e com a produção de materiais necessários à produção de biomassa. Como exemplo, têm-se polissacarídeos, lipídeos, proteínas, ácidos nucléicos e outros (Lima et al., 2001).

Demain (2000) define metabólitos primários como pequenas moléculas intermediárias ou produtos finais das vias do metabolismo intermediário que

atuam como blocos construtores de moléculas essenciais ou são convertidos em coenzimas. Já os metabólitos secundários, sem função no crescimento, seriam moléculas essenciais para a sobrevivência dos organismos que as produzem e estruturalmente derivados dos produtos do metabolismo primário. Segundo Lambrechts & Pretorius (2000), a produção de metabólitos secundários varia com as espécies e linhagens de leveduras.

Os metabólitos primários são produzidos durante a fase logarítmica de crescimento dos microrganismos, ou seja, na fase exponencial de crescimento celular. Os metabólitos secundários, entretanto, não são produzidos até que o microrganismo tenha completado toda sua fase de crescimento logarítmico e tenha iniciado a fase estacionária do ciclo de crescimento (Tortora, 2002).

Os metabólitos secundários não estão diretamente envolvidos com o suprimento energético da célula nem com seus componentes estruturais e, freqüentemente, não aparentam valor para os fungos (Moore-Landecker, 1996).

## **2.5 Importantes metabólitos provenientes do processo fermentativo**

O esquema de formação dos principais compostos em processos fermentativos encontra-se na Figura 1.

A levedura *Saccharomyces* é um microrganismo de metabolismo aeróbio facultativo, ou seja, possui a habilidade de se ajustar metabolicamente, tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose (ausência de oxigênio molecular). Os produtos finais da metabolização do açúcar irão depender das condições ambientais em que a levedura se encontra. Enquanto uma porção do açúcar é transformada em biomassa, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O em aerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO<sub>2</sub> em anaerobiose, processo denominado de fermentação alcoólica (Lima et al., 2001).





### **2.5.1 Etanol**

O etanol é um composto formado por meio da via Embden-Parnas (EMP), ou via glicolítica (Campbell, 2003), a partir da união de ácido pirúvico com a coenzima tiamina difosfato (TPP) produzindo um complexo denominado de piruvato ativado que, descarboxilado, origina o complexo acetaldeído ativado, o qual é quebrado para formar acetaldeído e TPP. O acetaldeído é reduzido a álcool etílico recebendo íons hidrogênio da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) (Moore-Landecker, 1996).

A concentração de etanol determina a viscosidade dos vinhos e atua também como um fixador do aroma (Avakyants et al., 1981). Ele é produzido durante a fermentação alcoólica numa concentração ao redor de 12% a 15% (v/v) (Aranda et al., 2002).

Segundo Carlile et al. (2001), o etanol é o principal produto do metabolismo das leveduras e pode ser inibitório de seu crescimento em concentrações elevadas. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode tolerar uma concentração máxima de álcool de 10% a 12% (v/v). Entretanto, a tolerância ao etanol varia consideravelmente, de acordo com as linhagens de leveduras (Kenke & Bisson, 1993).

### **2.5.2 Glicerol**

O glicerol é um importante constituinte do vinho, sendo produzido na fermentação alcoólica, na proporção de 5g.L<sup>-1</sup> a 10g.L<sup>-1</sup> (Hashizume, 2001). O glicerol, formado durante a elaboração de vinhos por leveduras, é conhecido por causar “off-flavour” em bebidas alcoólicas e por desempenhar um importante papel no aroma e “bouquet” de vinhos (Brandolini et al., 2002).

Este composto é produzido por redução de diidroxiacetona fosfato a glicerol-3-fosfato que é, então, desfosforilado para produzir glicerol (Estruch,

2000). Segundo Ohmiya et al. (1997), o glicerol é sintetizado no citossol de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* a partir do intermediário glicolítico dihidroxiacetona fosfato em duas etapas que são catalisadas por glicerol-3-fosfato desidrogenase (Gpd) e glicerol-3-fosfatase (Gpp), respectivamente. A formação do glicerol está acoplada à manutenção do equilíbrio redox celular e se constitui no mais abundante dos compostos secundários da fermentação (Lima et al., 2001). Em condições anaeróbicas, o glicerol é formado para reoxidar o composto nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), formado no anabolismo e sínteses de ácidos orgânicos.

O metabolismo do glicerol em célula de levedura é afetado por fatores de crescimento, como substrato e concentração inicial do substrato, temperatura, pH, taxa de inoculação, taxa de aeração e fonte de nitrogênio, dentre outros. Aumentando a concentração inicial de açúcar, a produção de glicerol também aumenta, em função do estresse osmótico (Yalçin & Ozbas, 2004).

### **2.5.3 Álcoois superiores**

Os álcoois superiores podem ser produzidos diretamente a partir da fermentação de açúcar ou pelo catabolismo de aminoácido (Giudici et al., 1990). Estes compostos, bem como outras substâncias voláteis, influenciam extremamente as propriedades aromáticas de vinhos (Bertolini et al., 1996). A combinação de concentrações elevadas de acetato, ésteres e pequenas concentrações de álcoois superiores aperfeiçoa a qualidade de vinhos, produzidos a baixas temperaturas (Argirion et al., 1996).

Rapp & Versini (1991) relataram que a concentração total de álcoois superiores abaixo de  $300\text{mg.L}^{-1}$  contribuiu para a complexidade de aromas agradáveis do vinho. Entretanto, quando sua concentração ultrapassou a  $400\text{mg.L}^{-1}$ , estes compostos foram considerados como um fator negativo para a

sua qualidade. A concentração total de álcoois superiores pode ser afetada por vários fatores, como condições climáticas, composição do mosto, temperatura e procedimentos fermentativos.

Durante o processo fermentativo, as leveduras produzem, naturalmente, álcoois de alto peso molecular, como n-propanol, álcool isoamílico, álcool amílico, álcool isobutílico e 2-fenetil álcool (Bertolini et al., 1996). O 2-fenetil álcool é citado como uma substância que apresenta agradável odor de rosa e pode ser considerado como um atributo positivo para o vinho, quando presente em baixa concentração. Os álcoois isobutílico e isoamílico são considerados indesejáveis nos vinhos. Segundo Hashizume (2001), os álcoois superiores sempre encontrados nos vinhos são: 1-propanol, 1-butanol, 2-butanol, 2-metilpropanol, 2-metil-1-butanol, 1-pentanol e 1-hexanol.

#### **2.5.4 Ácidos orgânicos**

Nos vinhos, os principais ácidos orgânicos provenientes da uva são o d-tartárico, l-málico e l-cítrico e os principais provenientes da fermentação são succínico, láctico e acético. A maior parte dos ácidos orgânicos no vinho encontram-se na forma livre, constituindo a acidez total (Hashizume, 2001).

Os ácidos tartárico e málico são encontrados no mosto em proporções acima de 90% dos ácidos presentes e em vinhos que não desenvolveram fermentação malolática, representando, assim, os ácidos de maior contribuição para a acidez do vinho (Dartiguenave et al., 2000).

A acidez é um dos mais importantes parâmetros organolépticos em vinhos e deve-se, principalmente, à presença de ácidos orgânicos fracos. Praticamente todos estes ácidos encontrados em vinho estão presentes na uva e uma pequena quantidade deles é produzida durante a fermentação alcoólica, como o ácido succínico e o acético. A concentração desses ácidos depende de

fatores como a natureza do mosto, da atividade microbiana desenvolvida pela linhagem de levedura e das práticas enológicas envolvidas no processo de produção do vinho (Ramon-Portugal et al., 1999).

Esses ácidos estão em equilíbrio com outros sais, atuando como tampão e mantendo o pH dos vinhos de 2,9 a 4, justificando seu importante papel biotecnológico, em fermentações industriais (Dartiguenave et al., 2000). O crescimento ativo de leveduras acidifica o meio devido à secreção de prótons durante o transporte de nutrientes, secreção direta de ácidos orgânicos e desenvolvimento progressivo de CO<sub>2</sub> (Walker, 1998). As alterações no pH do meio de cultura podem afetar o pH das células de leveduras e seu metabolismo, durante a fermentação do vinho. Assim, é muito importante a presença dos ácidos no sistema tamponante do mosto de vinho (Torija et al., 2003).

### **2.5.5 Ésteres**

Os ésteres são produzidos por leveduras durante a fermentação alcoólica em uma reação entre álcoois e acetil-CoA catalisada por álcool acetil transferase e outras enzimas (Zohre & Erten, 2002). Eles estão presentes em pequenas quantidades em uvas, mas, sua formação é paralela à formação do etanol. O aroma básico dos vinhos tem sido atribuído a: quatro ésteres, como etil acetato, isoamil acetato, etil caproato e caprilato; a dois álcoois, como o isobutílico e isoamílico, e acetaldeído. Os demais compostos presentes somente atenuam o aroma básico (Avakyants et al., 1981).

Para a fermentação de vinhos, acreditava-se que os ésteres produzidos contribuíam significativamente para o desejado aroma (Rapp & Mandery, 1986). Segundo Fujii et al. (1994), o “flavour”, característico de frutas em vinhos e de outras bebidas alcoólicas derivadas de uva, é, primeiramente, devido a uma mistura de hexil acetato, etil caproato e etil caprilato (aroma semelhante ao da

maçã), isoamil acetato (aroma semelhante à banana) e 2-feniletil acetato (“flavour” de flor e fruta). Em *Saccharomyces cerevisiae*, a álcool acetil transferase (AATase), codificada pelo gene ATF1, constitui-se em uma importante enzima para a formação de ésteres de acetato. Observa-se, também, que sua atividade é fortemente reprimida, sob condições altamente aeróbicas, pela adição de ácidos graxos insaturados no meio de cultura (Fujii et al., 1997).

A influência do etil acetato no aroma pode ser negativa, em concentrações maiores que  $150\text{mg.L}^{-1}$ , ao passo que, em concentrações menores de  $50\text{mg.L}^{-1}$ , ele pode aumentar a complexidade do vinho (Fraile et al., 2000).

Durante a fermentação, as leveduras produzem ésteres de cadeia longa e curta. As temperaturas mais baixas favorecem a formação de ésteres de cadeia curta, que apresentam aroma de fruta. As temperaturas mais altas favorecem a formação dos ésteres de cadeia longa (Ough, 1996).

### **2.5.6 Aldeídos**

O aldeído encontrado em maior quantidade nos vinhos é o acetaldeído, cuja concentração pode chegar a  $300\text{mg.L}^{-1}$  (Maarse & Vischer, 1989). Esse composto é responsável por 90% do total dos aldeídos, sendo formado pela descarboxilação do piruvato. Representa, assim, um importante produto secundário da fermentação de vinho (Ciani, 1997).

Segundo Suomalanien & Lehtonen (1979), os aldeídos são considerados os mais importantes compostos do aroma em vinhos, por causa do seu baixo valor de concentração mínima (“threshold”). O acetaldeído é altamente volátil e, quando presente em excesso, produz coloração verde não desejável na bebida e aroma de maçã. Este composto é usualmente mascarado na bebida pela adição de dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ) (Osborne et al., 2000).

### 2.5.7 Cetonas

O diacetil (2,3-butanodiona) é produzido durante a fermentação alcoólica e malolática, representando um importante composto do “flavour”, no vinho. A sua concentração varia de  $0,05\text{mg.L}^{-1}$  a  $4,1\text{mg.L}^{-1}$  (Etievant, 1991). Esse composto, quando presente na bebida, em alta concentração, pode dar um aroma de manteiga ao vinho, estando sua presença associada à bactéria ácido láctica, que promove a fermentação malolática (Rankine et al., 1969).

O diacetil é acumulado durante a fermentação alcoólica como um resultado da descarboxilação da  $\alpha$ -acetolactato, um composto sintetizado por *S. cerevisiae* e excretado da célula para o meio fermentativo (Suomalainen & Ronkainen, 1968). Altas concentrações de diacetil são algumas vezes quantificadas em vinhos não maloláticos (Rankine et al., 1969), devido às grandes adições de  $\text{SO}_2$  e ou à remoção de *S. cerevisiae*, por centrifugação, imediatamente após o final da fermentação alcoólica (Martineau et al., 1995).

A acetoina é formada, durante fermentação, pela atividade de bactéria ácido láctica e leveduras. Sua quantidade é variável no vinho e fica próxima de  $80\text{mg.L}^{-1}$  (Romano & Suzzi, 1996).

### 2.5.8 Metanol

Concentrações de metanol estão normalmente presentes em vinhos. É um álcool proveniente da hidrólise da pectina e seu teor varia de 0 a  $635\text{mg.L}^{-1}$ , com a média ficando em  $100\text{mg.L}^{-1}$ . Os vinhos obtidos pela adição de enzima pectinolítica ao mosto, por fermentação em tinto ou com casca e vinhos obtidos por maceração prolongada, da casca de uvas, têm o seu teor de metanol aumentado. A pectina é um composto formado pela associação de centenas de moléculas de ácido galacturônico, possuindo fragmentos de moléculas de

metanol, as quais são liberadas durante o processo fermentativo (Hashizume, 2001).

## **2.6 Estresses em ambiente fermentativo**

Durante a vinificação, as células de leveduras estão sujeitas a diversas condições de estresse e sua sobrevivência depende de sua habilidade para adaptar-se, rapidamente, a essas mudanças ambientais. A principal mudança que as leveduras enfrentam é o progressivo decréscimo na concentração de nutrientes essenciais. Isso leva a um permanente ajuste da genética e da maquinaria metabólica celular. Contudo, a vinificação inclui outras condições de estresse: baixo pH, estresse osmótico (devido ao alto teor de açúcar no mosto), limitação de nitrogênio, aumento na concentração de etanol e escassez de carbono no final do processo (Ivorra et al., 1999).

A resposta celular contra condições ameaçadoras, tais como altas temperaturas, estresse osmótico e estresse oxidativo, inclui diversas linhas de defesa (Martinez-Pastor et al., 1996). Para lutar contra os efeitos deletérios do estresse, as células desenvolveram uma rápida resposta molecular para reparar as mudanças e protegê-las contra posteriores exposições à mesma ou outras formas de estresse (Estruch, 2000). Essa rápida resposta consiste de componentes protetores, de baixo peso molecular, como trealose e proteínas reparadoras de sistemas, os quais são necessários para sobrevivência imediata (Martinez-Pastor et al., 1996). A seguir, inicia-se a ativação de sistemas de transdução de sinais, que dispara eventos secundários, como ativação de atividades enzimáticas pré-existentes e indução de transcrição de genes codificadores de fatores, com funções protetoras (Martinez-Pastor et al., 1996). Esse mecanismo molecular, induzido, sobre células expostas a condições adversas, é comumente designado de mecanismo de resposta ao estresse. O objetivo deste mecanismo é proteger a

célula dos efeitos destrutivos provocados pelo estresse e reparar quaisquer prejuízos moleculares, conduzindo ao ajustamento do metabolismo e outros processos celulares para um novo estado (Marger & Hohmann, 1997). Segundo esses mesmos autores, a resposta ao estresse não só resulta em reparo dos danos que tenham ocorrido, mas também conduzem a uma aquisição de tolerância a estresse e, dessa maneira, estabelece mecanismos que previnem a ocorrência de danos. A exposição a um suave estresse provoca melhor resistência a severo estresse. Assim, como resultado da resposta ao estresse, a célula produz uma série de proteínas em diferentes quantidades e atividades antes da exposição ao estresse.

Carrasco et al. (2001) conduziram um estudo de resistência a estresse em 14 linhagens comerciais de *S. cerevisiae*, analisando sua resistência a estresse oxidativo, choque térmico, hiperosmótico, etanol e inanição de glicose, e também examinou a expressão de genes codificadores de proteínas Hsp 12p e Hsp104p sob estas condições. Os resultados obtidos mostraram que as leveduras comerciais de vinho foram mais tolerantes a estas condições de estresse, quando comparadas às linhagens de laboratório.

Segundo Ivorra et al. (1999), as diversas condições de estresse (choque térmico, etanol, osmótico e estresse por inanição de glicose) analisadas em três leveduras comerciais de vinho indicaram uma relação entre resistência e vigor fermentativo, quando as menos resistentes mostraram problemas em conduzir a fermentação sob condições subótimas. Esses resultados apontam para a importância de se conhecer o comportamento das leveduras para o processo fermentativo, pois, inevitavelmente, durante este processo, as células estarão sujeitas a um ou mais condicionantes de estresse.

Segundo Zuzuarregui & Olmo (2004), o estresse oxidativo, estresse osmótico e estresse ao etanol são importantes condições durante a produção de biomassa e fermentação alcoólica. Esses autores analisaram o comportamento



fermentativo de 14 linhagens comerciais e não comerciais em diversos meios sintéticos. De acordo com os dados obtidos, estas linhagens foram classificadas em três grupos, dependendo da efetivação do processo fermentativo: grupo 1 - linhagens capazes de completar a fermentação em diversos mostos sintéticos; grupo 2 - linhagens incapazes de completar a vinificação, o que leva a uma baixa quantidade de açúcar residual no produto final e grupo 3 - linhagens incapazes de completar a vinificação e com baixo consumo de açúcar. A resistência dessas linhagens a diversas condições de estresse também foi determinada, sob condições de crescimento em laboratório. O estabelecimento de uma correlação entre os grupos baseados no comportamento fermentativo e resistência a diversas condições de estresse, especialmente oxidativo e etanólico, foi determinado indicando uma clara relação entre resistência a estresse e comportamento fermentativo, trazendo possibilidades do uso desta informação como um critério de futura seleção de leveduras de vinho.

## **2.7 Estresse osmótico**

O estresse osmótico é uma condição desfavorável para as células de leveduras, ocorrendo no início da vinificação (Carrasco et al., 2001), devido à alta concentração de açúcar do mosto (Aranda et al., 2002).

Um controle da quantidade de água é essencial para todo tipo de célula. Quando as leveduras são expostas a choque hiperosmótico, a perda de água citoplasmática ocorre e diversos mecanismos são iniciados para contrapor-se a desidratação da célula, protegendo as estruturas celulares (Estruch, 2000).

Os mais efetivos solutos osmoreguladores em leveduras são poliálcoois, particularmente o glicerol. As células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, quando tratadas com NaCl, respondem a estas mudanças no potencial osmótico do meio com aumento intracelular de  $K^+$ ,  $Na^+$ , glicerol e trealose. Na presença

de reduzido potencial de água, muitas leveduras têm capacidade, preferencialmente, para reter e ou induzir a síntese de glicerol, a fim de controlar o potencial intracelular do meio e, assim, controlar o efeito deletério da desidratação da célula. As mudanças na pressão osmótica externa da célula induzem mudanças correspondentes na expressão de certos genes em levedura, os quais estão envolvidos no controle dos níveis de solutos como o glicerol (Walker, 1998). Esse procedimento constitui um indicativo de que o glicerol é produzido e acumulado na célula de levedura como uma resposta ao estresse osmótico.

*Saccharomyces cerevisiae* e outras leveduras têm sido testadas para produção de glicerol sob estresse osmótico e observou-se que os isolados dessa levedura exibiram um alto nível de tolerância osmótica e alto rendimento em glicerol (Petrovska et al., 1999).

Segundo Sharma (1997), o efeito do estresse salino na resistência ao etanol, em células de *Saccharomyces cerevisiae*, evidencia que as células crescidas sob condições hipersalinas apresentam um aumento na concentração de trealose. Este aumento na concentração de trealose pode contribuir para a sobrevivência das células sob condições estressantes e, assim, potencializar a capacidade das leveduras de resistir a concentrações tóxicas de etanol.

## **2.8 Estresse etanólico**

O estresse ao etanol é, provavelmente, uma das mais interessantes condições para análise, já que um critério tradicional usado para a seleção de linhagens de leveduras do vinho é a tolerância ao etanol, haja vista as altas concentrações desse álcool durante a vinificação (Carrasco et al., 2001).

O etanol pode afetar o crescimento microbiano, a viabilidade celular e os parâmetros da fermentação. Assim, a definição de tolerância ao etanol é

depende de saber qual parâmetro está sendo estudado (D'Amore & Stewart, 1987). As medidas de tolerância ao etanol por leveduras têm envolvido também a determinação do efeito do etanol sobre habilidade fermentativa: a habilidade para fermentar glicose quando se mede a produção de CO<sub>2</sub> e a capacidade fermentativa como a quantidade máxima de etanol produzido durante a fermentação (Mishra & Kaur, 1991).

Um método muito empregado para determinar tolerância ao etanol envolve a supressão do crescimento celular na presença do álcool (D' Amore & Stewart, 1987). Pina et al. (2004) comentaram que, devido à simplicidade desse método, este se constitui num teste atrativo para separar grande número de linhagens por sua capacidade de tolerância ao etanol.

As altas concentrações de etanol têm um efeito prejudicial sobre proteínas, bicamada fosfolipídica e outros componentes celulares (Rose, 1993). Em consequência disso, há uma limitação do crescimento do microrganismo e de sua atividade metabólica, bem como do rendimento desse álcool (Guerzoni et al., 1994). Essas influências prejudiciais do etanol sobre o crescimento, viabilidade e fermentação de *S. cerevisiae* são largamente explicadas em função de seus efeitos nos processos associados à membrana (Rose, 1993).

Segundo Alexandre & Charpentier (1998), os efeitos tóxicos do etanol para as células de *Saccharomyces cerevisiae* envolvem modificação na composição lipídica da membrana, redução da atividade metabólica, inibição do transporte de glicose para o interior da célula, inibição do crescimento, viabilidade e supressão na formação de produtos.

## **2.9 Estresse oxidativo**

O estresse oxidativo é uma condição desfavorável que afeta leveduras durante a produção de biomassa (Carrasco et al, 2001), sendo importante

também quando células de leveduras são inoculadas no mosto (Zuzuarregui & Olmo, 2004).

Quando em crescimento aeróbico, as leveduras têm que contrapor com a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), como peróxido de hidrogênio  $H_2O_2$ , radical hidroxila ( $HO^\cdot$ ) ou ânions superóxido ( $O_2^\cdot^-$ ). Essas espécies são geradas por processos metabólicos de respiração ou  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, bem como por exposição a pro-oxidantes, como  $H_2O_2$  ou metal pesado (Estruch, 2000). Gordon et al. (1999), usando gel de eletroforese, identificaram 167 proteínas, cuja expressão muda com o tratamento de  $H_2O_2$ , incluindo muitas delas em atividades antioxidantes das leveduras.

Os radicais superóxidos e peróxido de hidrogênio não são muito reativos, mas eles podem ser convertidos a radicais hidroxilas, que são oxidantes muito fortes, pela reação Haber-Weiss ( $H_2O_2 + O_2^\cdot^- \rightarrow OH + OH^- + O_2$ ). Esta reação é catalisada por transição de metais como ferro e cobre (Soares Netto, 2001).

Devido à natureza destrutiva das EROs, os organismos, crescendo aerobicamente, têm desenvolvido mecanismos para proteger seus componentes celulares contra oxidantes, o qual envolve a síntese e a ativação de protetores enzimáticos ou moleculares (Stephen et al., 1995).

### **2.10 Defesas antioxidantes em *Saccharomyces cerevisiae***

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta uma variedade de mecanismos de defesa contra danos oxidativos, como atividades enzimáticas, presença de antioxidantes, seqüestradores de metais e diversos mecanismos de reparação (Maris et al., 2001).

Caso as espécies reativas de oxigênio escapem dos prévios sistemas de defesa, estas podem atingir biomoléculas, provocando lesões oxidativas. Tais

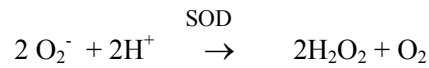
lesões podem ser reparadas por vários sistemas, em que a maioria age sobre o DNA, enquanto alguns atuam sobre as proteínas e lipídeos (Soares Netto, 2001).

O ânion superóxido é um produto secundário do metabolismo aeróbico, o qual é pouco reativo, mas serve como precursor de espécies reativas de oxigênio. Essas espécies são altamente reativas e deletérias, incluindo o radical hidroxila (Maris et al., 2001).

O peróxido de hidrogênio pode ser catabolizado pelas catalases e peroxidases. Em leveduras, a resistência a peróxido tem sido associada a níveis intracelulares de glutathione (GSH) (Izawa et al., 1995), implicando num importante papel da glutathione peroxidase (GPx), também nesses organismos. A utilização de GSH resulta na sua interconversão para formar glutathione oxidada (GSSG), a qual é reciclada para sua forma reduzida pela GSSG-redutase na presença de NADPH (Maris, 2000).

Lee et al. (1999) relataram que a superóxido dismutase desempenha importante papel na proteção de organismos aeróbios contra danos oxidativos. As superóxido dismutase (SOD) são enzimas que fazem a dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio. A levedura *S. cerevisiae* contém a Mn-SOD, produto do gene SOD2, localizada na matriz mitocondrial e CuZn-SOD, produto do gene SOD1, presente no citoplasma, núcleo e lisossomos (Longo et al., 1999). Segundo Jamieson et al. (1994), a Cu/ZnSOD é uma enzima envolvida na remoção dos ânions superóxidos do citoplasma e, possivelmente, também do peroxissoma, enquanto a função fisiológica da MnSOD parece ser a proteção da mitocôndria dos superóxidos gerados durante a respiração e a exposição ao etanol.

Segundo Pelczar (1997), a enzima superóxido dismutase elimina os radicais superóxidos convertendo-os rapidamente em peróxido de hidrogênio, como mostrado na equação:



O peróxido de hidrogênio produzido por esta reação pode ser metabolizado por duas outras enzimas: catalase e peroxidase. A catalase protege as células contra peróxido de hidrogênio, que pode ser gerado pela reação catalisada pela superóxido dismutase, como visto na reação acima, ou por  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos em peroxissomos, entre outros processos (Soares Netto, 2001). Segundo Izawa et al. (1996), as catalases são necessárias para a detoxificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante fase estacionária. Na reação da catalase, que inativa o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , uma das duas moléculas de peróxido de hidrogênio é oxidada a oxigênio molecular e a segunda é reduzida à água, segundo a reação:



A enzima peroxidase converte peróxido de hidrogênio em água.

Além das defesas enzimáticas, como catalase e superóxido dismutase, todas as células possuem sistemas de defesa não enzimática para proteger seus componentes celulares contra radicais livres e espécies reativas de oxigênio, e assim manter o estado redox celular. O mais importante desse sistema é a glutathiona, um tripeptídeo composto de glutamato, cisteína e glicina. As propriedades antioxidantes da glutathiona devem-se ao grupo tiol com resíduo de cisteína. A glutathiona também se liga a metais de transição, especialmente cobre e age na primeira linha de defesa antioxidante (Soares Netto, 2001). O importante papel da glutathiona na resposta adaptativa de *Saccharomyces cerevisiae* a danos oxidativos é sugerido pelo aumento da sensibilidade a  $\text{H}_2\text{O}_2$  e pela supressão da resposta adaptativa a  $\text{H}_2\text{O}_2$  causada por esgotamento de glutathiona celular (Izawa et al., 1995). A glutathiona pode agir como um varredor

de radical livre, com o grupo sulfidril com ação redox, reagindo com oxidantes para produção de glutatona oxidada (GSSG) (Jamieson, 1992).

Stephen et al. (1996) analisaram a importância da glutatona na proteção de levedura *Saccharomyces cerevisiae* contra estresse oxidativo, por meio de mutantes deficientes em glutatona sintetase. Esses autores comprovaram a importância da glutatona, por meio da hipersensibilidade desenvolvida pelos mutantes, nas fases exponencial e estacionária da cultura. Também relataram que, apesar da hipersensibilidade, tais mutantes são capazes de induzir respostas adaptativas aos oxidantes.

A glutatona e a tioredoxina estão normalmente envolvidas em reações redoxes celulares, em particular aquelas envolvidas no estabelecimento e manutenção da estrutura terciária de proteínas (Mager & Hohmann, 1997). A tioredoxina é uma proteína que participa de várias reações redox por intermédio de oxidação reversível de seu centro ativo, ditiol para disulfeto. A tioredoxina disulfeto, dessa maneira formada, é posteriormente reduzida para a forma ditiol, por ação da tioredoxina redutase. O sistema tioredoxina é composto por tioredoxina (Trx), tioredoxina redutase (Trr) e NADPH (Pedrajas et al., 1999).

A resistência das células depende, em parte, de sua capacidade para aumentar os mecanismos de defesa antioxidante, após desafios oxidativos. Depois do estresse oxidativo ocorre uma regulação do gene da levedura para glutatona redutase que regenera a glutatona e recompõe sua ação reparadora (Grant et al., 1996).

### **2.11 Respostas adaptativas ao estresse em leveduras**

A síntese de proteínas relacionadas ao estresse é entendida pelas células como fator de sobrevivência e adaptação a condições adversas. A tolerância induzida foi observada a partir de tratamentos leves de estresse em curto período

de exposição, resultando, assim, num aumento da tolerância contra uma subsequente, normalmente letal, dose de algum estresse. A mais direta interpretação desses resultados é que a presença de proteínas de estresse, previamente induzida por suave estresse, aumentou a tolerância celular (Estruch, 2000).

As células pré-tratadas com concentração subletal de um oxidante ( $H_2O_2$ , t-BOOH, paraquat) apresentaram indução de uma resposta protetora, permitindo sua sobrevivência a um tratamento com concentrações mais altas ou letais do oxidante (Izawa et al., 1995). Essa resposta adaptativa não é restrita ao estresse oxidativo; em leveduras, a resposta adaptativa mais conhecida é a do choque térmico, existindo também respostas similares para o estresse osmótico e para outros tipos de estresse. O pré-tratamento com um tipo de agente estressante pode também induzir resistência cruzada contra outro tipo de agente também estressante (Lee et al., 1999).

Uma exposição prévia ao dióxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e menadiona, substância geradora de superóxido, foi demonstrada em *Saccharomyces cerevisiae*. Essa exposição aumentou a resistência a níveis anteriormente tóxicos destes compostos, por meio da indução de genes e proteínas. Lee et al. (1999) propuseram a existência de dois reguladores paralelos de resposta ao estresse por  $H_2O_2$ , que seriam controlados pelos fatores de transcrição Yap1 e Skn7, envolvendo a indução de mais de 30 proteínas (Lee et al., 1999). Os genes controlados por Yap1 codificam produtos essenciais na manutenção do estado redox da célula.



### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F. A. P.; CARNEIRO, E. V.; LIMA, J. R.; SOUZA, A. Elaboração em escala piloto de bebidas gasificadas a partir de suco de banana clarificado, In: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 4., 2001, Campinas. **Resumos...** Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2001. p. 215.

ALEXANDRE, H.; CHARPENTIER, C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hamp. Shire, v. 20, n. 1, p. 20-27, Jan. 1998.

AMARAL, A. K. **SELEÇÃO DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* para produção da bebida fermentada de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*)**. 2004. 128 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ARANDA, A.; QUEROL, A.; OLMO, M. del. Correlation between acetaldehyde and ethanol resistance and expression of HSP genes in yeast strains isolated during the biological aging of sherry wines. **Archives Microbiology**, New York, v. 177, n. 4, p. 304-312, Apr. 2002.

ARGIRION, T.; KALIAFAS, A.; PSARIANOS, K.; KAMELLAKI, M.; VOLIOTIS, S.; KONTINAS, A.. Psychrotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains after an adaptation treatment for low temperature wine making. **Process in Biochemistry**, New York, v. 31, n. 7, p. 639-643, 1996.

ARRUDA, A. R.; CASIMIRO, A. R. S. de; GARRUTI, D. S.; ABREU, F. A. P. Processamento de bebida fermentada de banana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 34, n. 2, p. 161-167, Out. 2003.

AVAKYANTS, S. P.; RASTYANNIKOV, E.G.; CHERNAYAGA, B. S.; NAVROSTSKII, V. J. Khromato-mass-spektrometricheskoe issledovanie letuchikh vesnchestv vina. Vinodel. **Vinograd.**, Moscou, v. 41, p. 50-53, 1981.

BERTOLINI, L.; ZAMBONELLI, C; GIUDICI, P.; CASTELLARI, L. Higher alcohol production by cryotolerant *Saccharomyces* strains. **American Journal. Enology and Viticulture**. Davis, v. 47, n. 3, p. 343-345, 1996.

BRANDOLIN, V.; SALZANO, G.; MAIETTI, A., CARUSO, M., TEDESCHI, P., ROMANO, P. Automated multiple development method for determination of

glycerol produced by wine yeasts. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 481- 485, 2002.

BRASIL. **Lei n. 7678-08 out. 1988**. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. Brasília: Ministério da Agricultura e de Abastecimento.

BRASIL. Decreto n. 2314 de 4 de setembro de 1997 regulamenta a lei n. 8918 de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a padronização e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 19549, 5 de set. 1997.

CAMPBELL, M. K. (Traduzido por FERREIRA, H. B. et al.). **Bioquímica**. 3<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2003, 752 p.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The fungi**. 2<sup>a</sup> ed. Califórnia: Academia Press, 2001. 558 p.

CARRASCO, P.; QUEROL, A.; OLMO, M. del. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. **Archives Microbiology**, New York, v. 175, n. 6, p. 450-457, 2001.

CIANI, M. Role, enological properties and potential use of non-Saccharomyces wine yeast. **Recent Research Development Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 317-31, 1997.

D' AMORE, T.; STEWART, G. Ethanol tolerance of yeast. **Enzyme Microbial Technology**, Woburn, v. 9, n. 6, p. 322-330, 1987.

DARTIGUENAVE, C.; JEANDIT, P.; MAUJEAN, A. Study of the contribution of major organic acids of wine to the buffering capacity of wine in model solutions. **American Journal Enology and Viticulture**, Davis, v. 51, n. 4, p. 352-356, 2000.

DIAS, D. R. **Elaboração de bebida fermentada a partir de frutas tropicais**. 2001, 130 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; LIMA, L. C. O. Metodologia para elaboração de fermentado de cajá (*Spondias mombin* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 342-350, set./dez. 2003.

DONADIO, L. C. **Cuidados com a jaboticabeira**. São Paulo: O Estado de São Paulo, 1983. p. 16

DONADIO, L. C. **Jaboticaba (Myrciaria jaboticaba (Vell.) Berg)**. Editado por Luiz Carlos Donadio. Jaboticabal: Funep, 2000. 55 p.

ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, n. 4, p. 469-486, Oct. 2000.

ETIEVANT, P. X. Wine. In: MAARSE, H. **Volatile compounds in food and beverages**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 483-546.

FEUILLAT, M.; CHARPENTIER, C.; MASSAUTIER, C. Winemaking interest of cryotolerant strains of *Saccharomyces* sp. **Revue des Oenologues et des Techniques Vitivinicoles et Oenologiques**, Paris, v. 85, p. 18-21, 1997.

FLEET, G. H.; HEARD, G. M.; Yeasts – growth during fermentation. In: Fleet, g. h. (ed.), **Wine Microbiology and Biotechnology**. Harwood Academic Publishers, chur, Switzerland, p. 25-55, 1993.

FLEET, G. H. Wine. In: DOYLE, M. P.; BEAUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. **Journal Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. 1997. 768 p.

FRAILE, P.; GARRIDO, J.; ANCIN, C. Influence of a *Saccharomyces cerevisiae* Selected Strain in the Volatile Composition of Rosé Wines. Evolution during Fermentation. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 5, p. 1789-1798, May 2000.

FUJII, T.; NAGASAWA, N.; IWAMATSU, A.; BOGAKI, T.; TAMAI, Y.; HAMACHI, M. Molecular cloning, sequence analysis and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 8, p. 2786-2792, Aug. 1994.

FUJII, T.; KOBAYASHI, O.; YOSHOMOTO, H.; FURUKAWA, S.; TAMAI, Y. Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 3, p. 910-915, Mar. 1997.

GIUDICI, P., ROMANO, P., ZAMBONELLI, C. A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 36, n. 1, p. 61-14, Jan. 1990.

GORDON, C.; LAGNIEL, G.; LEE, J.; BUHLER, J. M.; KIEFFER, S.; PERROT, M.; BOUCHERIE, H.; TOLEDANO, M. B.; LABARRE, J. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 24, p. 22480-22489, 1999.

GRANT, C. M.; COLLINSON, L. H.; ROE, J. H. DAWES, I. W. Yeast glutathione reductase is requires for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 171-179, July 1996.

GUERZONI, M. E., LANCIOTTI, R., SINIGAGLIA, M., ANESE, M., LERICE, C. R. Influence of some selected ions on system water activity and on ethanol vapour pressure and its inhibitory action on *Saccharomyces cerevisiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 40, n. 12, p. 1051-1056, Dec. 1994.

HASHIZUME, T. Tecnologia do vinho. In: AQUARONE, E.; BORZANE, W.; SCHEMEDELL, W.; LIMA, U. de A. **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. 2001. v. 4, 523p.

IVORRA, C.; PEREZ-ORTIN, J. E.; OLMO, M. del. An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. **Biotechnology and bioengineering**, New York, v. 64, n. 6, p. 698-708, Sept. 1999.

IZAWA, S., INOUE, Y., KIMURA, A. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FBES Letters**, Amsterdam, v. 368, n. 1, p. 73-76, July 1995.

IZAWA, S.; INOUE, Y.; KIMURA, A. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry Journal**, London, v. 320, n. 1, p. 61-67, Nov. 1996.

JAMIESON, D. J. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.174, n. 20, p. 6678-6681, Oct. 1992.

JAMIESON, D. J.; RIVERES, S. L.; STEPHEN, D. W. S. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. **Microbiology**, Reading, v. 40, n. 12, p. 3277-3283, Dec. 1994.

KUNKEE, R. E.; BISSON, L. F. Wine-making Yeasts. In: **The Yeasts**. v. 5, second edition. 1993.

LAMBRECHTS, M. G.; PRETORIUS, I. S. Yeast and its importance to wine aroma- a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, Pretoria, v. 21, n. 1, p. 97-129, 2000.

LEE, J.; GORDON, C.; LAGNIEL, G.; SPECTOR, D.; GARIN, J.; LABARRE, J. and TOLEDANO, M. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, n. 23, p. 16040-16046, June 1999.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, (coords). **Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, v. 3, p. 1-39, 2001.

LONGO, V. D.; LIOU, L-L.; VALENTINE, J. S.; GRALLA, E. B. Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 365, n. 1, p. 131-142, May 1999.

LONGO, E. VELÁZQUEZ, J. B.; SIEIRO, C.; CANSADO, J. CALO, P.; VILLA, T. G. Production of higher alcohols, ethyl acetate, acetaldehyde and other compounds by 14 *Saccharomyces cerevisiae* wine strains isolated from the same region ( Salnés, N. W. Spain). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 8, n. 5, p. 539- 541, Sept. 1992.

MAARSE, H.; VISCHER, C.A. Volatile Compounds in Food. Alcoholic Beverages. Qualitative and Quantitative Data, TNO-CIVO, **Food Analysis Institute**, AJ Zeist, The Netherlands, 1989.

MAGALHÃES, M. M.; BARROS, R. S.; FINGER, F. L. Candes in structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 66, n. 1-2, p. 17-22, Sept. 1996.

MARGER, H. W.; HOHMANN, S. Stress response mechanisms in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: \_\_\_\_\_ **Yeast Stress Responses**. Landes Company, p. 1-5, 1997.

MARIS, A. F.; KERN, A. L.; PICADA, J. N.; BOCCARDI, F.; BRENDDEL, M.; HENRIQUES, J. A. P. Glutathione, but not transcription factor Yap1, is required

for carbon source-dependent resistance to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, New York, v. 37, n. 3, p. 135-182, Mar. 2000.

MARIS, A. F.; ASSUMPÇÃO, A. L. K.; BRENDDEL, D. B. M.; HENRIQUES, J. A. P. Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. **Current Genetics**, New York, v. 39, n. 3, p. 137-149, May 2001.

MARTINEAU, B.; HENICH-KLING, T. Formation and Degradation of Diacetyl in wine During Alcoholic Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* Strain EC1118 and Malolactic Fermentation with *Leuconostoc oenos* Strain MCW. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 46, n. 4, p. 442-448, 1995.

MARTINEZ-PASTOR, M. T.; MARCHLER, G.; SCHÜLLER, C.; MARCHLER-BAUER, A.; RUIS, H.; ESTRUCH, F. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). **The EMBO Journal**, Oxford, v. 15, n.9, p. 2227-2235, May 1996.

MATTOS, J. R. de. **Fruteiras nativas do Brasil: jaboticabeiras**, São Paulo: Nobel, 1983. 92p.

MISHRA, P.; KAUR, S. Lipids as modulators of ethanol tolerance in yeast. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, v. 34, n. 6, p. 697-702, Mar. 1991.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**. 4 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1996.

MUNIZ, C. R.; BORGES, M. de F.; ABREU, F. A. P. de.; TIEKO, R. Bebidas fermentadas a partir de frutos tropicais. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 20, n. 2, jul./dez. 2002.

OHMIYA, R.; AIBA, H.; YAMADA, H.; MIZUNO, T. Clarification of the promoter structure of the osmoregulated *gpd1<sup>+</sup>* gene encoding an isozyme of NADH-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase in fission yeast. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Toquio, v. 61, n. 3, p. 553-555, Mar. 1997.

OKAMURA-MATSUI, T.; TOMADA, T.; FURKADA, S.; OHSUGI, M. Discovery of alcohol dehydrogenase from mushrooms and application to alcoholic beverages. - a review – **Journal Molecular Catalysis B: enzymatic**, Amsterdam, v. 23, p. 133-144, 2003.

OSBORNE, J. P.; ORDUÑA, R. Mira de.; PILONE G. J.; LIU, S. Q. Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 191, n. 1, p. 51-55, Oct. 2000.

OUGH, C. S. **Tratado básico de enología**. Tradução de Concepción Llaguno Marchena e Maria Dolorez Cabezudo Ibañes. Zaragoza: Acribia, 1996. 294 p. tradução de: Winemaking basics.

PEDRAJAS, J. R.; KOSMODOU, E.; MIRANDA-VIZUETE, A.; GUSTAFSSON, J. A.; WRIGHT, A. P.; SPYROU, G. Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, n. 10, p. 6366-6373, Mar. 1999.

PATARO, C.; SANTOS, A.; CORREA, S. R.;MORAIS, P. B.; LINARDI, V.R.; ROSA, C. A. Physiological characterization of yeasts isolated from artesian fermentation in aguardente distillery. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 104-108, Apr./June 1998.

PELCZAR Jr., J. M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**, v. 1, 2 ed., 1997, 524p.

PETROVSKA, B.; WINKELHAUSEN, E.; KAZMANOVA, S. Glycerol production by yeasts under osmotic and sulfite stress. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 45, n. 8, p. 695-699, Aug. 1999.

PINA, C.; ANTÓNIO, J.; HOGG, T. Inferring ethanol tolerance of *Saccharomyces* and non- *Saccharomyces* yeasts by progressive inactivation. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 19, p. 1521-1527, Oct. 2004.

PRUDÊNCIO, A. J. Vinhos de mesa. Ver. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Núcleo Regional de Santa catarina. n. 09, junho, 1969.

RAMON-PORTUGAL, F.; SEILLER, I.; TAILANDIER, P.; FAVAREL, J. L.; NEPVEU, F.; STREHAINO, P. Kinetics of production and consumption of

organic acids during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, v. 37, n. 4, p. 235-240, Oct./Dec. 1999.

RANKINE, B.C.; FOMACHON, J.; BRIDSON, A. Diacetyl in Australian dry red wines and its significance in wine quality. **Vitis**, Siebeldingen Basel, v. 8, n. 8, p. 129-134, Aug. 1969.

RAPP, A.; MANDERY, H. Wine aroma. **Experientia**, v. 42, p. 873-884, 1986.

RAPP, A.; VERSINI, G. Influence of nitrogen compounds in grapes on compounds of wines. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN IN GRAPES AND WINES. **Anais...** Washington: The American Society for Enology and Viticulture, 1991. p. 156-164.

REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. Yeast technology. 2 ed. New York: **Van Nostrand Reinhold**, 1991. v.5, Cap 4, 454 p.

RIPONI, C.; CARNACINI, A.; ANTONELLI, A.; CASTELLARI, L.; ZAMBONELLI, C. Influence of yeast strain on the composition of wine the production of brandy. **Journal Wine Research**, Abingdon, v. 8, p. 41-55, 1997.

ROMANO, P.; SUZZI, G. Origin and Production of Acetoin during Wine Yeast Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 2, p. 309-315, Feb. 1996.

ROMANO, P.; SUZZI, G.; BRANDOLINI, V.; MENZIANI, E., DOMIZIO, P. Determination of 2,3 butanodiol in high and low acetoin producers of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts by automated multiple development (AMD). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 22, n. 4, p. 299-302, Apr. 1996.

ROSE, A. H. industrial importance the *Saccharomyces cerevisiae*. In: SKINNER, F. A. et al. **Biology and Activies of Yeast**, Ed. Academic Press., 1980

ROSE, A. H. Composition of the envelope layers of *Saccharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 74, p. 110-118, Sept. 1993.

ROSIER, J. P. **Manual de elaboração de vinho para pequenas cantinas**. 2.ed. Florianópolis: EPAGRI, 1995. 72 p.



SANDHU, D. K.; JOSHI, V. K. Technology quality and scope of fruit wines especially apple beverages. **Indian Food Industry**, New Delhi, v. 14, n. 1, p. 24-34, 1995.

SHARMA, S. C. A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.152, n. 1, p. 11-15, July 1997.

SILVA, M. A. A. de; SILVA, G. A. da. **Leveduras selecionadas para elaboração de vinho**. Bento Gonçalves, RS: EMBRAPA-CNPUVU: Centro de pesquisa de uva e vinho, 1987, 19 p.

SOARES, B. N.; POMMER, V. C.; SARMENTO, M. DE M. B. RIBEIRO, A. J. I. ARAÚJO, P. A.; JUNG-MENDAÇOLLI, S.; PEREIRA, A. R. **Jaboticaba: instruções de cultivo**. Editado por Ivo Manica. Porto Alegre, RS: Cinco Continentes, 33 p. 2001.

SOARES NETTO, L. E. Oxidative stress response in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 1-4, p. 93-102, 2001.

SOUFLEROS, E. H.; PISSA, I.; PETRIDIS, D.; LYGERAKIS, M.; MERMELAS, K., BOUKOUVALAS, G.; TSIMITAKIS. Instrumental analysis of volatile and other compounds of greek kiwi wine; sensory evaluation and optimisation of its composition. **Food Chemistry**, v. 75, n. 4, p. 487-500, Dec. 2001.

STANBURY.P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**. 2.ed. Great Britain: Pergamon, 1995. 357p.

STASKENKO, H.; MACKU, C.; TAKAYUKI, S. Monitoring volatile chemicals formed from must during yeast fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, n. 11, p. 2257-2259, Nov. 1992.

STEPHEN, S. W. D.; RIVERS, L. S.; JAMIESON, D. L. The role of the YAP1 and YAP2 genes in the regulation of the adaptative oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 415-423, 1995.

STEPHEN, D. W. S., JAMIESON, D. J. Glutathione is an important molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 141, n. 2-3, p. 207-212, Aug. 1996.

SUOMALAINEN, H., RONKAINEN, P. Mechanism of diacetyl formation in yeast fermentation. **Nature**, London, v. 220, n. 5169, p. 792-793, 1968.

SUOMALAINEN, H.; LEHTONEN, M. The production of aroma compounds by yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 85, n. 3, p. 149-156, 1979.

TORIJA, J.M.; BELTRAN, G.; NOVO, M.; POBLET, M.; ROZES, N.; MAS, A.; GUILLAMON, J. M. Effect of Organic Acids and Nitrogen source on alcoholic Fermentation: Study of their Buffering Capacity. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 4, p. 916-922, Feb. 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. CASE, C. L. **Microbiologia**. 6<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 827 p.

VALERO, E.; MOYANO, L.; MILLAN, C. M.; MEDINA, M.; ORTEGA, M. J. Higher alcohols and esters production by *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of the initial oxygenation of the grape must. **Food Chemistry**, Oxford, v. 78, n. 1, p. 57-61, July 2002.

WALKER, G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology**, Wiley: West Sussex, U.K., 1998.

YALÇIN, S. K., ÖZBAS, Z. Y. Effects of different substrate on growth and glycerol production kinetics of a wine yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* Narince 3. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 39, n. 10, p. 1285-1291, June 2004.

ZOHRE, D. E.; ERTEN, H. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 38, n. 3, p. 319-324, Nov. 2002.

ZUZUARREGUI, A.; OLMO, M. del. Analysis of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 85, n. 4, p. 271-280, May 2004.

## **CAPÍTULO 2**

### **RESISTÊNCIA AOS ESTRESSES OXIDATIVO, ETANÓLICO E OSMÓTICO, POR ISOLADOS DE *Saccharomyces***

## 1 RESUMO

GUIMARÃES, Débora Pereira. **Resistência aos estresses oxidativo, etanólico e osmótico, por isolados de *Saccharomyces***. Lavras: UFLA. 2006. Cap. 2. p. 37-60. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)\*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência das linhagens *Saccharomyces*, após os tratamentos de estresses oxidativo, etanólico e osmótico. Treze linhagens de leveduras foram utilizadas, 5 isolados de *S. cerevisiae* pertencentes à coleção do laboratório de Fisiologia de Microrganismos da UFLA, 2 de *S. bayanus*, 1 híbrido e 5 isolados das fermentações da indústria alcoólica (SA-1, PE-2, BG, CAT-1 e VR-1). Para avaliar o estresse oxidativo células em crescimento exponencial e em fase estacionária foram tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na concentração de 33%. Resultados mostraram que as linhagens na fase estacionária apresentaram resistência mais elevada ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> já com células crescidas até a fase exponencial. A concentração de álcool utilizada para avaliar o estresse etanólico das linhagens foi de 10 a 12% (v/v). Na concentração de etanol a 10%, a viabilidade celular variou entre 49,18% e 89,78% e, na concentração de 12%, variou entre 26,28% e 78,77%. As linhagens mais resistentes ao estresse etanólico foram CA 116, CA 1186 e SA-1. A resistência das linhagens ao estresse osmótico foi avaliada com adição de KCl 0,7M e 1,0M. A viabilidade celular com KCl 0,7M foi de 82,36% a 90,24% e com KCl 1,0 M foi de 60,00% a 78,89%. As linhagens mais resistentes ao estresse oxidativo foram CA 1187, CA 1183, CAT-1, VR-1, SA-1 e BG. De modo geral, as linhagens CA 1162, CA 1186 e SA-1 foram as que tiveram melhor desempenho frente aos estresses, podendo, portanto, ser indicadas para os processos fermentativos na elaboração de bebidas fermentadas.

---

\*Orientadora: Professora Dra. Rosane Freitas Schwan-UFLA.

## 2 ABSTRACT

GUIMARÃES, Débora Pereira. **Resistance to the oxidative, ethanol and osmotic stresses, by *Saccharomyces* isolates.** Lavras: UFLA. 2006. Chap. 2. p. 37-60. Dissertation (Master in Agricultural Microbiology)\*.

The objective of this work was to evaluate the resistance of *Saccharomyces* strains submitted to oxidative, ethanol and osmotic stress treatments. Thirteen strains were utilized in this work, 5 were isolates of *S. cerevisiae* belonging to the Microbial Physiology laboratory of UFLA; 2 of *S. bayanus*, 1 hybrid and 5 isolates of industrial fermentation (SA-1, PE-2, BG, CAT-1 and VR-1). To evaluate the oxidative stress, cells in exponential and stationary phase were treated with 33% of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The results showed that cells in stationary phase showed more resistance than those in exponential phase of growth. The ethanol stress was observed using 10 and 12% of the product. The cell viability ranged from 49.18% and 89.78% among strains when 10% of ethanol was used and cell viability decreased when the ethanol concentration was of 12%, ranging from 26.28% to 78.77%. The most resistant strains to ethanol stress were CA 116, CA 1186 and SA-1. The resistance to osmotic stress was evaluated with addition of KCl 0.7M and 1.0 M KCl, independently, in YEPG culture medium. Cell viability with 0.7M KCl varied from 82.36% to 90.24% and with 1.0M KCl was from 60.00% to 78.89%. The most resistant strains to 1.0 M KCl were CA 1187, CA 1183, CAT-1, VR-1, SA-1 and BG. In general the CA 1162, CA 1186 e SA-1 strains had better performance in relation to the stress evaluated, therefore it could be suggested that they can be used as starter to elaborated fermented beverages.

---

\*Adviser: Professor Dr. Rosane Freitas Schwan – UFLA.

### 3 INTRODUÇÃO

A fermentação alcoólica é uma etapa essencial na produção de vinho, usualmente desempenhada por leveduras, pertencentes à espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Durante o processo fermentativo, as células de leveduras podem estar sujeitas a uma variedade de pressões biológicas, químicas e fisiológicas, usualmente conhecidas como estresse. A sobrevivência das células pode depender de sua capacidade para adaptar-se rapidamente às mudanças ambientais (Ivorra et al., 1999). Na luta contra os deletérios efeitos do estresse, as células têm desenvolvido uma rápida resposta molecular para reparar os danos e proteger-se contra posteriores exposições à mesma forma de estresse (Estruch, 2000).

O estresse osmótico é uma condição desfavorável para as células de leveduras, ocorrendo no início da vinificação (Carrasco et al., 2001), devido à alta concentração de açúcar do mosto (Aranda et al., 2002). Na presença de reduzido potencial de água, muitas leveduras têm capacidade, preferencialmente, para reter e ou induzir a síntese de glicerol, a fim de controlar o potencial intracelular do meio e, assim, controlar o efeito deletério da desidratação da célula.

Outra condição desfavorável é o estresse oxidativo que afeta leveduras durante a produção de biomassa (Carrasco et al., 2001), sendo importante também quando células de leveduras são inoculadas no mosto (Zuzuarregui & Olmo, 2004). Quando em crescimento aeróbico, as leveduras têm que contrapor com a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), como peróxido de hidrogênio  $H_2O_2$ , radical hidroxila ( $HO^\cdot$ ) ou ânions superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Essas espécies são geradas por processos metabólicos de respiração ou  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (Estruch, 2000). As EROs são moléculas extremamente reativas e capazes de danificar um grande número de componentes celulares (Maris et al.,

2000). Devido à natureza destrutiva das EROs, os organismos, crescendo aerobicamente, têm desenvolvido mecanismos para proteger seus componentes celulares contra oxidantes, o qual envolve a síntese e a ativação de protetores enzimáticos ou moleculares (Stephen et al., 1995).

O etanol é um metabólito progressivamente produzido durante a fermentação alcoólica. Aumentos na concentração desse metabólito podem inicialmente ser inibitórios e, posteriormente, letais para as leveduras (Walker, 1998). Esse álcool pode afetar o crescimento microbiano, a viabilidade celular e os parâmetros da fermentação. (D'Amore & Stewart, 1987).

O conhecimento do comportamento das leveduras em situações de estresses é muito importante, para que se tenha conhecimento de suas capacidades fermentativas. Simulando situações encontradas nas vinificações, podem-se obter parâmetros na seleção de leveduras, que melhorem a eficiência da fermentação comercial. Ivorra et al. (1999) compartilharam essa idéia, pois afirmaram que a habilidade das leveduras em resistir ao estresse, durante a vinificação, pode determinar suas propriedades fermentativas. Segundo Martinez-Pastor et al. (1996), as células de leveduras expostas a suaves estresses osmótico, oxidativo e choque térmico desenvolvem tolerância, não somente às altas concentrações do mesmo agente estressante, mas também contra estresses causados por outros agentes (resistência cruzada).

Diante da diversidade microbiana existente e da necessidade de um aproveitamento melhor de suas particularidades de interesse para a vinificação, geradas pela exploração do seu metabolismo, em processos biotecnológicos, o estudo do comportamento de linhagens torna-se importante para a otimização do processo e, conseqüentemente, melhoria na qualidade da bebida. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a resistência ao estresse osmótico, etanólico e oxidativo em 13 linhagens de leveduras do gênero *Saccharomyces* em dois estádios de crescimento.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada no presente trabalho, para os tratamentos de estresse, foi adaptada de Aranda et al. (2002), Carrasco et al. (2001), Ivorra et al. (1999), Martinez-Pastor et al. (1996), Stephen et al. (1995) e Zuzurregui & Olmo (2004).

### 4.1 Leveduras

As 13 linhagens de leveduras utilizadas e suas origens são mostradas na Tabela 1. Essas linhagens foram isoladas do processo fermentativo de cachaça, vinho e álcool combustível.

**TABELA 1** Linhagens de leveduras utilizadas nos tratamentos de estresses e da microvinificação de jabuticaba.

<b>Linhagem</b>	<b>Espécie</b>	<b>Origem</b>	<b>SO</b>
L1 CA 1183	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	DBI/UFLA	cachaça
L2 CA 116	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	DBI/UFLA	cachaça
L3 CA 1162	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	DBI/UFLA	cachaça
L4 CA 1184	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	DBI/UFLA /Itália	vinho
L5 CA 1185	<i>S.bayanus cryotolerant 12233</i>	DBI/UFLA/Itália	vinho
L6 CA 1186	<i>S. 12233x6167.1A</i>	DBI/UFLA/Itália	híbrida
L7 CA 1187	<i>Saccharomyces bayanus</i>	DBI/UFLA	vinho
L8 IZ 888	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ESALQ	vinho
L9 SA-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ESALQ	álcool*
L10 CAT-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ESALQ	álcool*
L11 VR-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ESALQ	álcool*
L12 PE-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ESALQ	álcool*
L13 BG	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ESALQ	álcool*

*S.*= *Saccharomyces*; SO= substrato de origem; álcool\*= álcool combustível; L= linhagem



#### **4.2 Preparo da cultura estoque e condições de crescimento celular**

A pureza dos microrganismos utilizados neste trabalho foi verificada pela análise das características morfológicas e microscópicas de colônias isoladas, obtidas em estrias compostas, no meio YW (extrato de levedura, 3,0g.L<sup>-1</sup>; extrato de malte, 3,0g.L<sup>-1</sup>; peptona bacteriológica, 5,0g.L<sup>-1</sup>; glicose, 10,0g.L<sup>-1</sup> e ágar, 15,0g.L<sup>-1</sup>). As culturas estoques foram preparadas em tubos e em frascos para congelar, a partir dessas colônias puras e mantidas sob refrigeração.

As células de leveduras foram cultivadas em YEPG líquido (extrato de levedura, 10,0g.L<sup>-1</sup>; peptona bacteriológica, 10,0g.L<sup>-1</sup> e glicose, 20,0g.L<sup>-1</sup>). A incubação foi conduzida com agitação em incubadora refrigeradora (“Shaker”) MA 830/A, sob temperatura de 28°C e a 150 rpm.

#### **4.3 Preparo do inóculo**

Para a adaptação das células das leveduras foi preparada uma cultura, em placa, incubada a 28°C, por 24 horas. Essa cultura foi preparada pela adição de 100µL da cultura estoque, em placa de Petri. Após o período de 24 horas, foram transferidas três alçadas, independentes, dessa cultura para três Erlenmeyers de 125mL, contendo 20mL, por unidade, de YEPG líquido. Esses frascos foram incubados, em incubadora refrigeradora (“shaker”), por aproximadamente 18 horas, a 28°C e sob agitação de 150 rpm.

#### **4.4 Promoção do estresse oxidativo**

Para a adaptação das células de leveduras em novo meio de cultura foi preparada uma cultura, conforme descrição no item 4.3 (preparo do inóculo).

O tratamento oxidativo foi iniciado após o período de 18 horas de cultivo, com  $10^6$  células.mL<sup>-1</sup> na cultura, contadas em câmara de Newbauer. Uma alíquota de 100µL dessa cultura padronizada foi inoculada em placa de Petri, com YEPG, e distribuída em toda a placa, por espalhamento. A seguir, foi colocado, no centro da placa, um disco de papel de filtro, com diâmetro 0,5cm, que recebeu uma alíquota de 10µL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), a 33%. As placas obtidas, em duplicata, foram incubadas em BOD, a 28°C, por 24 horas.

A análise da tolerância das células ao peróxido de hidrogênio foi realizada a partir da medida do diâmetro (mm) da zona de inibição, com auxílio de um paquímetro.

#### **4.5 Promoção do estresse alcoólico**

Para a adaptação das células de leveduras em novo meio de cultura foi preparada uma cultura conforme descrição no item 4.3 (preparo do inóculo). Após o período de 18 horas de incubação, as células foram crescidas em sistema de batelada alimentada por mais 48 horas.

Para determinar a tolerância das linhagens de leveduras ao etanol, foram preparadas e testadas duas diferentes concentrações de etanol, a 10% e 12%, ambas volume por volume.

O experimento foi iniciado com  $10^7$  células.mL<sup>-1</sup>, alcançadas após 48 horas de cultivo. Para cada linhagem, em triplicata, foram adicionados volumes de 13mL e 15,6mL de etanol, correspondendo às concentrações de 10% e 12%, respectivamente. Após a adição do álcool, as culturas permaneceram incubadas por um período de 90 minutos (10% de etanol) e 60 minutos (12% de etanol) conforme metodologia sugerida por Zuzuarregui & Olmo (2004).

Diluições decimais foram preparadas, plaqueadas em YEPG, em duplicata e incubadas, a 28°C, até o aparecimento das primeiras colônias.

Um plaqueamento foi realizado com células de leveduras, que não foram expostas à condição de estresse, em YEPG, para ser utilizado como controle.

#### **4.6 Promoção do estresse osmótico**

Para a adaptação das células de leveduras em novo meio de cultura e manutenção das células de leveduras foi preparada uma cultura, conforme descrição no item 4.3 (preparo do inóculo).

Como indutor do estresse osmótico, foi utilizado cloreto de potássio (KCl) nas concentrações finais de 0,7M e de 1,0M (Zuzuarregui & Olmo, 2004). A concentração de 0,7M representa a atividade de água de 0,977, similar à encontrada na vinificação e a concentração de 1,0M representa uma baixa atividade de água ( $a_w = 0,967$ ), segundo Chen (1989).

Esse experimento foi iniciado após as 48 horas de cultivo, quando a cultura em crescimento (item 4.2) atingiu a concentração de, aproximadamente,  $10^7$  células.mL<sup>-1</sup>.

Para a obtenção da solução final de KCl 0,7M, utilizou-se uma solução de 25mL de YEPG, acrescida de 6,518g de KCl, adicionada aos 100mL da cultura, preparada em Erlenmeyer, da cultura em crescimento. Para a obtenção da solução final de KCl 1,0 M, utilizou-se uma solução de 25mL de YEPG, acrescida de 9,312g de KCl, que foi adicionada aos 100mL da cultura em crescimento.

Após os tratamentos com KCl 1,0M e 0,7M, as culturas permaneceram incubadas por 1 e 2 horas, respectivamente (Zuzuarregui & Olmo, 2004). Após

esse período as placas contendo YEPG, em duplicata, foram incubadas, a 28°C, até o aparecimento das primeiras colônias.

Um plaqueamento foi realizado com células de leveduras, que não foram expostas à condição de estresse, em YEPG, para ser utilizado como controle.

#### **4.7 Viabilidade celular**

A viabilidade das células, após os tratamentos de estresses etanólico e osmótico, foi medida pela contagem de colônias em placas contendo YEPG, obtidas pela técnica de espalhamento. Esse plaqueamento foi realizado em duplicata e a viabilidade foi expressa pela porcentagem de unidades formadoras de colônias, por mililitro (UFC.mL<sup>-1</sup>), contadas antes do tratamento de estresse.

#### **4.8 Análise estatística**

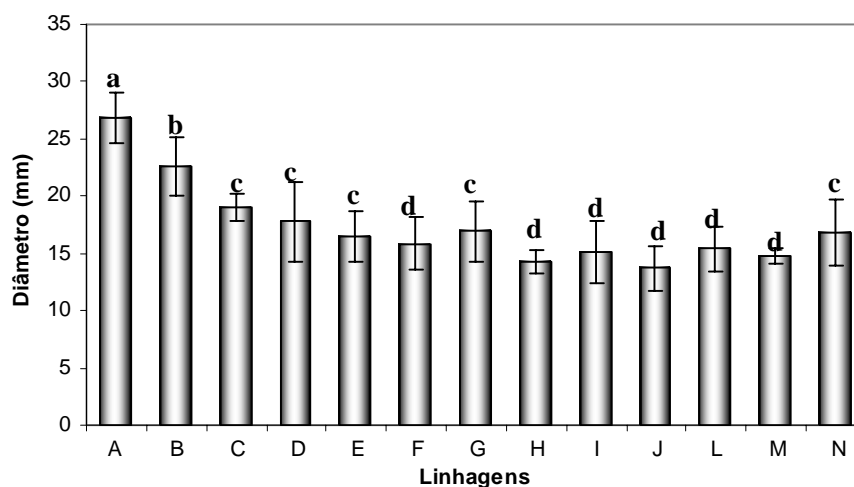
Os experimentos foram estruturados em delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos, três repetições e duas parcelas em cada repetição. Os dados obtidos foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando o software de estatística SISVAR (Ferreira, 2000).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Resistência ao estresse oxidativo

Os diâmetros de inibição, obtidos pelo tratamento de estresse oxidativo, sobre as leveduras em fase exponencial podem ser observados na Figura 2.

As linhagens analisadas, após o estresse oxidativo, apresentaram variações significativas ( $P < 0,01$ ) de resistência à ação do peróxido de hidrogênio. As linhagens IZ 888 (diâmetro de 26,82mm) e CA 1187 (diâmetro de 22,65mm) foram cepas que apresentaram os valores médios mais elevados, para o diâmetro do anel de inibição. Portanto, essas linhagens mostraram-se menos resistentes ao estresse pela substância oxidante.



**FIGURA 2** Valores médios dos diâmetros de inibição, com seus respectivos desvios-padrão, obtidos pelo tratamento de estresse oxidativo, em leveduras *Saccharomyces*, na fase exponencial. As médias representadas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 1% de probabilidade. As linhagens utilizadas foram: **A** – IZ 888; **B** – CA 1187; **C** – CA 1184; **D** – CA 1183; **E** – CA 116; **F** – CA 1186; **G** – CA 1185; **H** – CA 1162; **I** – VR-1; **J** – PE-2; **L** – SA-1; **M** – BG; **N** – CAT-1.

Os dados obtidos e representados na Figura 2 indicam que todas as outras linhagens apresentaram halo de inibição de crescimento, numa faixa compreendida entre 13,73mm e 19,03mm.

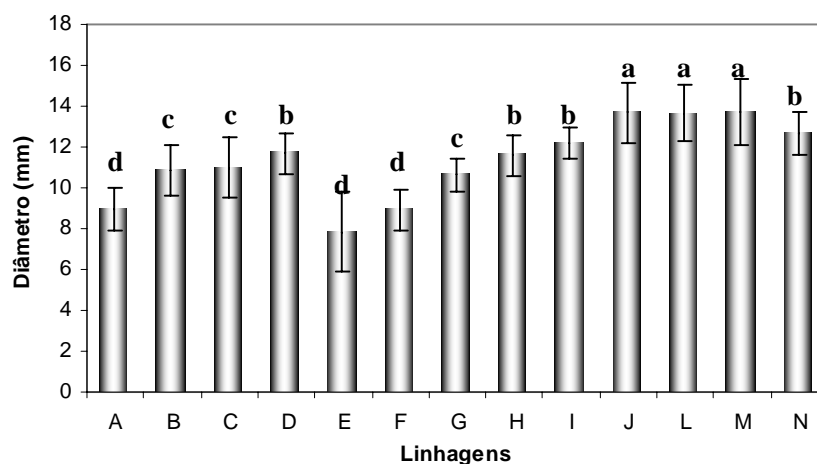
Pelos dados obtidos, foi possível visualizar a formação de dois diferentes grupos, em relação ao estresse oxidativo. O primeiro grupo formado pelas linhagens CA 1184, CA 1183, CA 116, CA 1185 e CAT-1, apresentaram valores médios variando de 16,50mm a 19,03mm e outro, formado pelas linhagens CA 1186, VR-1, PE-2, SA-1, BG e CA 1162, com valores médios de 13,73mm a 15,82mm. O primeiro grupo, com maior halo de inibição, correspondeu, principalmente, às linhagens de leveduras cultivadas por vários anos em laboratório, não habituadas à fermentação e, portanto, mais susceptíveis ao estresse oxidativo. Uma exceção ocorreu para a linhagem CAT-1, que apresentou menor resistência, mesmo sendo isolada, mais recentemente, da fermentação industrial durante a produção de álcool combustível. O segundo grupo, apresentando menor halo de inibição, correspondeu às linhagens de leveduras fermentativas, da indústria de álcool, portanto menos susceptíveis ao estresse oxidativo. Exceções ocorreram para as linhagens CA 1162 e CA 1186, que apresentaram maior resistência ao estresse oxidativo, mesmo estando depositadas na coleção do DBI/UFLA desde 2000.

Para as linhagens pertencentes ao mesmo grupo, não houve efeito significativo do tratamento de estresse oxidativo, indicando que essas linhagens apresentaram resistências similares a esse tratamento de estresse.

Os dados obtidos para o tratamento de estresse oxidativo concordam com os de Carrasco et al. (2001). Esses autores analisaram a resistência de leveduras *Saccharomyces*, isoladas de vinho, sendo 14 comerciais, uma não comercial e uma amplamente utilizada em laboratório (W303). Esses autores observaram que as leveduras do vinho são mais resistentes ao estresse oxidativo que a linhagem de laboratório. Ivorra et al. (1999) também constataram o

estresse oxidativo, em *Saccharomyces cerevisiae*, com as linhagens industriais LYCC 047, LYCC 082 e T73 e com a linhagem de laboratório W303. Esses autores adicionaram H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a 5mM, às linhagens de leveduras e a viabilidade foi reduzida. As linhagens mais afetadas foram a W303, com redução de 21% e a LYCC 047, com redução de 57% de viabilidade. Stephen et al. (1996) pesquisaram linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, em resposta ao estresse oxidativo. Eles mostraram que os genes YAP1 e YAP2 foram importantes na regulação da indução à resposta adaptativa, pelas leveduras.

Os diâmetros de inibição, obtidos pelo tratamento de estresse oxidativo, sobre as leveduras em fase estacionária estão descritos na Figura 3. O tratamento foi realizado com as células na concentração de 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.



**FIGURA 3** Valores médios dos diâmetros de inibição, com seus respectivos desvios-padrão, obtidos pelo tratamento de estresse oxidativo, em leveduras *Saccharomyces*, na fase estacionária. As médias representadas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade. As linhagens utilizadas foram: **A** – IZ 888; **B** – CA 1187; **C** – CA 1184; **D** – CA 1183; **E** – CA 116; **F** – CA 1186; **G** – CA 1185; **H** – CA 1162; **I** – VR-1; **J** – PE-2; **L** – SA-1; **M** – BG; **N** – CAT-1.

Os dados obtidos e representados na Figura 3 indicam que todas as linhagens apresentaram halo de inibição de crescimento, numa faixa compreendida entre 7,85mm e 13,70mm.

Com os dados apresentados nas Figuras 2 e 3, foi possível verificar que as leveduras em fase estacionária foram mais resistentes ao estresse oxidativo. Essa observação é compartilhada por Izawa et al. (1995), os quais investigaram a função da glutatona na resposta de *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem S288C, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esses autores obtiveram células dessa linhagem na fase estacionária com alta resistência ao agente oxidativo, com concentração de glutatona intracelular aproximadamente três vezes maior que na fase exponencial.

A resposta ao estresse oxidativo, na fase estacionária, é promovida pela glutatona, que sofre acréscimos devido à expressão de alguns genes e maior biossíntese desse composto, catalisada pelas enzimas glutamylcisteína sintetase e glutatona sintetase (Izawa et al., 1995). No presente trabalho, as células de leveduras na fase estacionária também apresentaram maior resistência à ação do peróxido de hidrogênio.

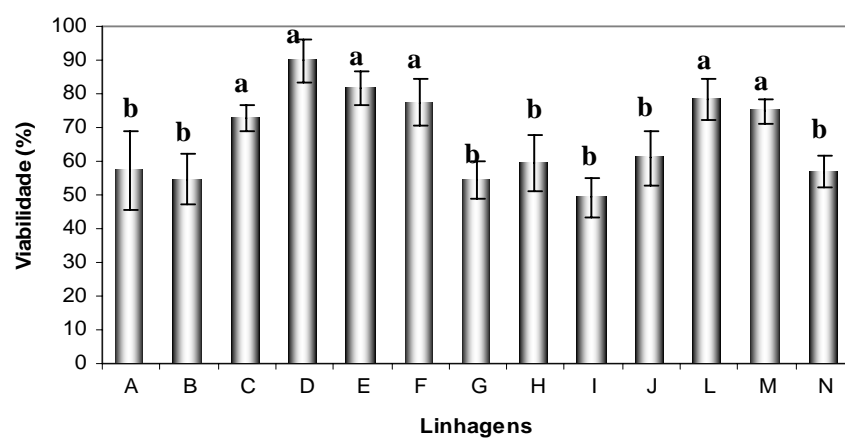
## **5.2 Resistência ao estresse etanólico**

Elevadas concentrações alcoólicas ocorrem durante, praticamente, toda a vinificação. Assim, é importante utilizar levedura com alta viabilidade celular diante das condições de estresse alcoólico, por ser esta uma situação real das vinificações comerciais.

Os dados da Figura 4 mostram a viabilidade celular das treze linhagens de leveduras *Saccharomyces*, após o tratamento de estresse etanólico a 10%. De acordo com esses dados, as cepas CA 1183, CA 1184, CA 116, CA 1186, SA-1 e BG apresentaram os valores médios mais elevados para a viabilidade celular, após o tratamento aplicado, variando de 73% a 90%. A viabilidade menos



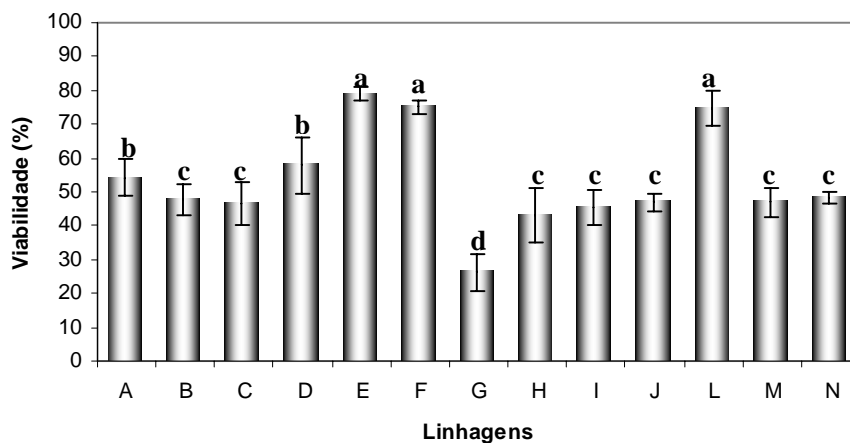
elevada ocorreu para as cepas IZ 888, CA 1187, CA 1185, CAT-1, PE-2, CA 1162 e VR-1, variando de 49% a 61%. Em relação à viabilidade celular, após estresse etanólico, não houve um predomínio acentuado do grupo de linhagens do laboratório ou do grupo das linhagens industriais.



**FIGURA 4** Valores médios da viabilidade, com seus respectivos desvios-padrão, obtidos pelo tratamento de estresse etanólico, a 10% (v/v) sobre as leveduras *Saccharomyces*. As médias representadas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 1% de probabilidade. As linhagens utilizadas foram: **A** – IZ 888; **B** – CA 1187; **C** – CA 1184; **D** – CA 1183; **E** – CA 116; **F** – CA 1186; **G** – CA 1185; **H** – CA 1162; **I** – VR-1; **J** – PE-2; **L** – SA-1; **M** – BG; **N** – CAT-1.

Os dados obtidos e representados na Figura 4 evidenciam que as cepas testadas suportaram bem a concentração de etanol a 10%, em volume (v/v). A linhagem CA 1183 manteve a viabilidade próxima a 90%.

A viabilidade celular das treze linhagens de leveduras *Saccharomyces*, após o tratamento de estresse etanólico a 12%, em volume, está representada na Figura 5.



**FIGURA 5** Valores médios de viabilidade celular, com seus respectivos desvios-padrão, obtidos pelo tratamento de estresse etanólico, a 12% (v/v), sobre as leveduras *Saccharomyces*. As médias representadas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 1% de probabilidade. As linhagens utilizadas foram: **A** – IZ 888; **B** – CA 1187; **C** – CA 1184; **D** – CA 1183; **E** – CA 116; **F** – CA 1186; **G** – CA 1185; **H** – CA 1162; **I** – VR-1; **J** – PE-2; **L** – SA-1; **M** – BG; **N** – CAT-1

O impacto do tratamento a 12% de etanol foi mais acentuado que a 10% (v/v), reduzindo a viabilidade celular de todas as linhagens analisadas. Várias cepas tiveram as viabilidades reduzidas, próximas a 50%. Entretanto, as linhagens CA 116, CA 1186 e SA-1 mantiveram os valores elevados de suas viabilidades, com uma variação entre 74% a 79%. O valor médio de viabilidade menor foi encontrado para a linhagem CA 1185, que apresentou viabilidade de apenas 26%.

Os tratamentos de estresse por etanol a 10% e a 12%, impostos às treze linhagens de leveduras, não apresentaram efeito significativo ( $P > 0,05$ ) sobre as linhagens CA 116, CA 1186 e SA-1, conforme o teste de Scott-Knott, indicando que essas linhagens foram bem tolerantes às concentrações alcoólicas e apresentaram resistências similares diante desses tratamentos. Ivorra et al. (1999) também observaram a resistência das leveduras na concentração de 10%. Das quatro linhagens que eles analisaram, apenas uma apresentou decréscimos de viabilidade, quando a concentração de etanol testada foi de 10% (v/v). Carrasco et al. (2001) testaram a tolerância ao etanol, em leveduras do vinho, sendo 14 linhagens comerciais de *Saccharomyces* e uma não comercial. Todas as leveduras utilizadas por eles foram tolerantes ao etanol a 10% (v/v).

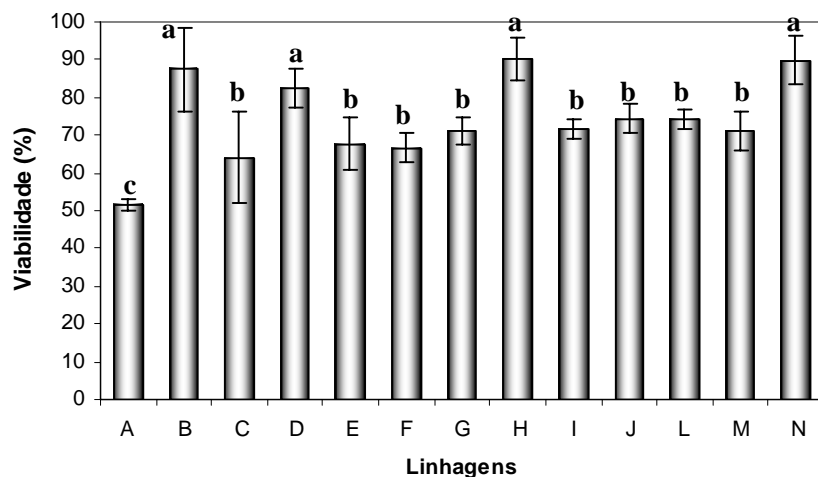
O acúmulo de etanol durante a fermentação dos açúcares diminuiu a viabilidade celular. Alexandre & Charpentier (1998) relataram os efeitos nocivos do etanol acumulado na fermentação. Esse álcool inibe o aporte de glicose para a célula, porque reduz a atividade das enzimas glicolíticas; as variações de 5 a 15% de etanol alteram as atividades das enzimas do sistema de transporte de glicose. O etanol inibe o fluxo de prótons para as células de leveduras, diminuindo a atividade da  $H^+$ ATPase da membrana plasmática e, assim, provocando decréscimos nas concentrações de nutrientes intracelulares. O etanol, após interagir com a membrana plasmática, altera sua polaridade, permite o livre trânsito de moléculas polares e altera sua permeabilidade. Assim, as

viabilidades das linhagens, em meio alcoólico, ficam na dependência da maior ou menor interação do etanol com as células de leveduras. Nesta pesquisa, a maior interação entre o álcool e as *Saccharomyces* ocorreu com a concentração alcoólica, a 12%, diminuindo a viabilidade celular.

### **5.3 Resistência ao estresse osmótico**

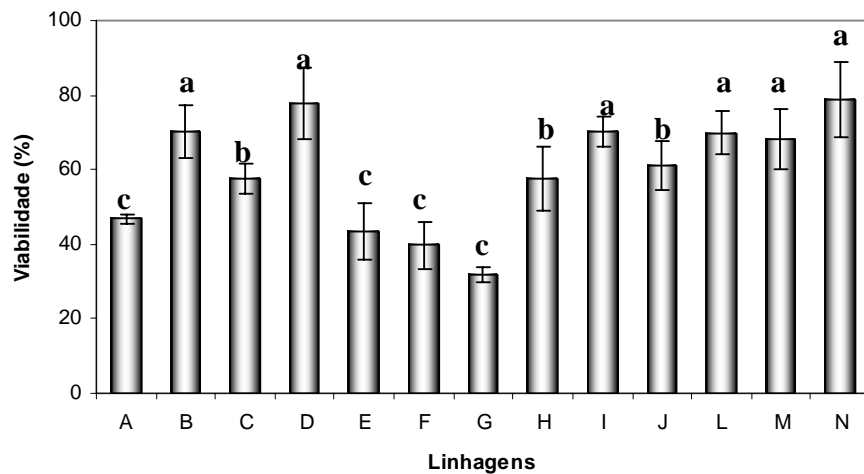
O estresse osmótico é característico do início da fermentação alcoólica, devido à alta concentração de açúcar do mosto (Aranda et al., 2002). A utilização de linhagens que mantêm uma viabilidade alta, no início da vinificação, pode proporcionar uma fermentação completa do mosto .

Os dados obtidos e representados na Figura 6 mostram o estresse osmótico provocado pela adição de KCl a 0,7M às treze linhagens de *Saccharomyces*. Os valores médios mais elevados, para a viabilidade celular, apresentaram variação entre 82% a 90%, referentes às linhagens CA 1187, CA 1183, CAT-1 e CA 1162, evidenciando-as como linhagens de elevada resistência, em meio salino a 0,7M. A menor viabilidade, próxima a 50%, ficou evidenciada para a linhagem IZ 888.



**FIGURA 6** Valores médios com seus respectivos desvios-padrão, do tratamento de estresse osmótico com KCl 0,7M, em *Saccharomyces*. As médias representadas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 1% de probabilidade. As linhagens utilizadas foram: **A** – IZ 888; **B** – CA 1187; **C** – CA 1184; **D** – CA 1183; **E** – CA 116; **F** – CA 1186; **G** – CA 1185; **H** – CA 1162; **I** – VR-1; **J** – PE-2; **L** – SA-1; **M** – BG; **N** – CAT-1.

Na Figura 7 são mostrados os dados obtidos do tratamento de estresse osmótico provocado pela adição de KCl a 1,0M às treze linhagens de *Saccharomyces*. Os valores médios mais elevados, para a viabilidade celular, apresentaram variação entre 68% a 79%, referentes às linhagens CA 1187, CA 1183, CAT-1, VR-1, SA-1 e BG. Assim, essas linhagens apresentaram maior resistência, em meio salino a 1%.



**FIGURA 7** Valores médios com seus respectivos desvios-padrão, do tratamento de estresse osmótico com KCl 1,0M, em *Saccharomyces*. As médias representadas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $P > 0,01$ ). Linhagens: **A** – IZ888; **B** – CA1187; **C** – CA1184 **D** – CA1183; **E** – CA116; **F** – CA1186; **G** – CA1185; **H** – CA 1162; **I** – VR-1; **J** – PE; **L** – SA; **M** – BG; **N** – CAT-1.

As Figuras 6 e 7 indicam a resistência das linhagens de leveduras pesquisadas, frente a um gradiente salino. Mesmo aumentando a concentração de KCl para 1,0M, pôde-se observar que a maioria das cepas manteve sua viabilidade acima de 70%. Exceção ocorreu para as linhagens CA 116, CA 1186 e CA 1185, que reduziram suas viabilidades para patamares próximos a 40%.

Dentre as leveduras *Saccharomyces* analisadas, destacam-se pelo menos três linhagens: CA 1186, SA-1 e CA 1162. A linhagem CA 1186 foi resistente ao estresse nas duas fases de crescimento, exponencial e estacionário, manteve-se viável ao estresse alcoólico nas concentrações de 10 e 12% e foi resistente à concentração de sais na concentração de 0,7M. A linhagem SA-1 foi resistente às concentrações de 0,7M e 1,0M de KCl, resistente ao estresse alcoólico a 10 e

12% e resistente ao estresse oxidativo na fase exponencial. Apesar de sua resistência aos estresses, a SA-1 não é indicada para a fabricação do fermentado de jabuticaba, pois a maioria dos metabólitos secundários do aroma é produzida na fase estacionária, onde sua resistência foi menos elevada (Figura 3). A linhagem CA 1162 apresentou resistência ao estresse oxidativo, em ambas as fases do crescimento, mostrou-se resistente ao estresse osmótico a 0,7 e 1,0 molar e resistente ao estresse etanólico, a 10%. Com as características observadas neste trabalho, essa linhagem pode ser indicada para a fabricação do fermentado de jabuticaba com graduação alcoólica até 10%.

## 6 CONCLUSÕES

Na fase exponencial, as linhagens do laboratório foram menos resistentes ao estresse oxidativo que as linhagens da indústria do álcool.

Todas as linhagens, na fase estacionária, mostraram-se mais resistentes ao estresse oxidativo que na fase exponencial.

As linhagens CA 1186, CA 116 e SA-1 foram as mais resistentes ao de estresse etanólico.

A linhagem CA 1185 apresentou resistência menos elevada ao estresse etanólico.

Não houve predomínio das linhagens do laboratório ou fermentativas, da indústria, em relação ao estresse osmótico.

As linhagens CA 1187, CA 1183, CAT-1 e CA 1162 apresentaram maior viabilidade celular, quando expostas em meio de estresse osmótico.

A linhagem IZ 888 apresentou a menor resistência, quando exposta aos estresses oxidativo e osmótico a 0,7M.

As linhagens CA 1186, SA-1 e CA 1162 apresentaram melhor performance, quando submetidas aos estresses oxidativos, etanólico e osmótico.

A linhagem CA 1162 pode ser indicada para a elaboração de bebida fermentada a partir de frutas, devido à sua resistência aos estresses submetidos e à sua boa produtividade de etanol.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDRE, H.; CHARPENTIER, C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hamp. Shire, v. 20, n. 1, p. 20-27, Jan. 1998.
- ARANDA, A.; QUEROL, A.; OLMO, M. del. Correlation between acetaldehyde and ethanol resistance and expression of HSP genes in yeast strains isolated during the biological aging of sherry wines. **Archives Microbiology**, New York, v. 177, n. 4, p. 304-312, Apr. 2002.
- CARRASCO, P.; QUEROL, A.; OLMO, M. del. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. **Archives Microbiology**, New York, v. 175, n. 6, p. 450-457, June 2001.
- CHEN, C. S. Water activity – concentration models for solutions of sugars, salts and acids. **Journal of Food Science**, Newfoundland, v. 54, n. 5, p. 1318-1321, Apr. 1989.
- ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, n. 4, p. 469-486, Oct. 2000.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR – Sistema de análise de variância para dados balanceados**: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos, versão 4,3. Lavras: UFLA / DEX, 2000.
- IVORRA, C.; PEREZ-ORTIN, J. E.; OLMO, M. del. An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. **Biotechnology and bioengineering**, New York, v. 64, n. 6, p. 698-708, Sept. 1999.
- IZAWA, S.; INOUE, Y.; KIMURA, A. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 368, n. 1, p. 73-76, July 1995.
- MARIS, A.F.; KERN, A. L.; PICADA, J. N.; BOCCARDI, F.; BRENDDEL, M. Glutathione, but not transcription factor Yap 1, is required for carbon source-

dependent resistance to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, New York, v. 37, n. 3, p. 175-182, Mar. 2000.

MARTINEZ-PASTOR, M. T.; MARCHLER, G.; SCHÜLLER, C.; MARCHLER-BAUER, A.; RUIS, H.; ESTRUCH, F. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). **The EMBO Journal**, Oxford, v. 15, n.9, p. 2227-2235, May 1996.

PATARO, C.; SANTOS, A.; CORREA, S. R.;MORAIS, P. B.; LINARDI, V.R.; ROSA, C. A. Physiological characterization of yeasts isolated from artesian fermentation in aguardente distillery. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 104-108, Apr./June1998.

STEPHEN, D. W. S., JAMIESON, D. J. Glutathione is an important molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 141, n. 2-3, p. 207-212, Aug. 1996.

STEPHEN, D. W. S.; RIVERS, S.L.; JAMIESON, D. J. The role of the YAP1 and YAP2 genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 415-423, 1995.

ZUZUARREGUI, A.; OLMO, M. del. Analysis of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 85, n. 4, p. 271-280, May 2004.

### **CAPÍTULO 3**

#### **POTENCIAL FERMENTATIVO DE TREZE ISOLADOS DE *Saccharomyces* NA MICROVINIFICAÇÃO DA JABUTICABA (*Myrciaria jaboticaba*)**

## 1 RESUMO

GUIMARÃES, Débora Pereira. **Potencial fermentativo de treze isolados de *Saccharomyces* na microvinificação da jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*).** Lavras: UFLA. 2006. Cap. 3. p. 61-97. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)\*.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar o processo fermentativo de linhagens de *Saccharomyces*, durante a microvinificação da jabuticaba. Os frutos de jabuticaba-sabará (*Myrciaria jaboticaba*) foram coletados no município de Lavras, MG, Brasil. Os frutos, após coleta, foram lavados, secos e prensados manualmente, obtendo-se a polpa. Treze linhagens de leveduras *Saccharomyces* (CA 1184, CA 1162, CA 1183, CA 1185, CA 1186, CA 1187, CA 116, SA-1, PE-2, BG, CAT-1, VR-1 e IZ 888) foram adicionadas, separadamente, em triplicata, no mosto de jabuticaba, a 15 °Brix. Essas vinificações, em escala de laboratório, foram acompanhadas por análises de pH, turbidimetria, sólidos solúveis totais, acidez titulável em ácido cítrico, consumo dos açúcares glicose, frutose e sacarose, por HPLC, quantificação de ácidos orgânicos, por HPLC e quantificação do composto volátil majoritário, por GC. O mosto de jabuticaba apresentou pH igual a 3,6, a acidez total titulável de 1,49% e sólidos solúveis totais de 13,5 °Brix. Os açúcares frutose e glicose foram consumidos pelas leveduras durante a microvinificação. A variação do °Brix se deu em duas fases: nas primeiras 48 horas, houve fermentação tumultuosa, com rápido consumo de açúcar do mosto e, na segunda fase, ocorreu com menor atividade dos microrganismos e menos tumulto. Todas as linhagens de leveduras pesquisadas conseguiram fermentar o mosto de jabuticaba. As linhagens CA 1186 e CA 1187 chegaram ao final da fermentação, com estabilização do °Brix, em 72 horas. As linhagens SA -1, VR-1, CAT-1 e CA 1185 estabilizaram com 96 horas e as demais alcançaram a estabilidade a partir de 120 horas de fermentação. A maior concentração de ácido orgânico encontrada foi do ácido cítrico, com 1,39g.100mL<sup>-1</sup>. As concentrações dos ácidos cítrico, benzóico, málico e malônico diminuíram durante a microvinificação e a concentração do ácido succínico cresceu. O composto volátil majoritário, quantificado na microvinificação da jabuticaba, foi o etanol. A concentração mais elevada, para esse álcool, foi encontrada na fermentação por CA 1162, sendo de 10,07% (v/v) e a menos elevada foi de 7,68% (v/v), na fermentação por CA 1186.

---

\*Orientadora: Professora Dra. Rosane Freitas Schwan – UFLA.

## 2 ABSTRACT

GUIMARÃES, Débora Pereira. **Fermentative potential of thirteen *Saccharomyces* isolates in the jaboticaba microvinification.** Lavras: UFLA. 2006. Chap. 3. p. 61-97. Dissertation (Master in Agricultural Microbiology)\*.

The aim of this work was to characterize the fermentative process of *Saccharomyces* strains during jaboticaba microvinification. The fruits of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) were collected in the town of Lavras, MG, Brazil. The fruits after collection, were washed and dried and pressed by hand, to obtain the pulp. Thirteen strains of *Saccharomyces* yeasts (CA 1184, CA 1162, CA 1183, CA 1185, CA 1186, CA 1187, CA 116, SA-1, PE-2, BG, CAT-1, VR-1 and IZ 888) were added, in triplicate, into the jaboticaba must at 15 °Brix. These vinifications, on a laboratory scale, were accompanied by analyses of pH, turbidimetry, total soluble solids, acidity titrable in citric acid, consumption of sugars glucose, fructose and sucrose, by HPLC, quantification of organic acids by HPLC, quantification of the major volatile compound by GC. The jaboticaba must presented pH value of 3.6, total titrable acidity of 1.49% and total soluble solids of 13.5 °Brix. The sugars glucose and fructose were consumed by yeasts during microvinification. The variation of °Brix occurred in two phases: in the first 48 hours, there was tumultuous fermentation with a fast consumption of sugar and the second phase occurred with less activity of microorganisms and less tumult. All the strains of yeasts studied succeeded in fermenting the jaboticaba must. The strains CA 1186 and CA 1187 reached the final of the fermentation showed by stabilization of °Brix in 72 hours, the strains SA-1, VR-1, CAT-1 and CA 1185 stabilized in 96 hours and the others reached stability after 120 hours of fermentation. The highest concentration of organic acid found was of citric acid with 1.39g.100mL<sup>-1</sup>. The concentrations of citric, benzoic, malic and malonic acid decreased during microvinification and the concentration of succinic acid increased. The major volatile compound quantified in the jaboticaba microvinification was ethanol. The highest concentration for this alcohol was found in the fermentation by CA 1162 reaching 10.07% (v/v) and the smallest ethanol concentration found was of 7.68% (v/v) in the fermentation by CA 1186.

---

\*Adviser: Professor Dr. Rosane Freitas Schwan – UFLA.

### 3 INTRODUÇÃO

Os microrganismos têm um importante papel na determinação da composição química do vinho. Eles podem interferir na qualidade da uva antes da colheita e, durante a fermentação, metabolizam o açúcar da fruta e outros componentes em etanol, dióxido de carbono e centenas de produtos secundários que, coletivamente, contribuem para sutileza e para a individualidade das características do vinho (Lambrechts & Pretorius, 2000).

Os principais agentes responsáveis pela fermentação alcoólica são as linhagens de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Essas linhagens são bem adaptadas às condições do mosto e podem crescer sob estas condições para completar a fermentação alcoólica (Martini & Vaughan-Martini, 1990).

Os processos metabólicos representam o centro da vida de um fungo, como são para qualquer outro organismo. Os nutrientes absorvidos do meio são convertidos, por reações anabólicas, em constituintes celulares, enquanto a energia pode ser derivada de nutrientes por reações catabólicas (Moore-Landecker, 1996). Os metabólitos primários são aquelas substâncias produzidas para promover o crescimento do microrganismo, como ácidos nucléicos, proteínas, carboidratos e lipídios. A produção de metabólitos primários está associada com a fase de crescimento rápido da levedura, a fase exponencial. Já os metabólitos secundários são substâncias não essenciais para o crescimento vegetativo, em cultura pura, ocorrendo quando a taxa de crescimento declina e durante a fase estacionária (Carlile et al., 2001).

Durante a fermentação alcoólica, as leveduras produzem diversos metabólitos secundários, como ácidos orgânicos, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas e polióis (Lambrechts & Pretorius, 2000). A variabilidade nas concentrações depende das espécies e das linhagens de leveduras presentes na fermentação (Fleet, 2003).

Os componentes não voláteis do vinho estão presentes em elevadas concentrações e são responsáveis pelo gosto e sensação tátil. Entretanto, a fração volátil, com compostos bem diversificados, é a mais importante para o aroma do produto. Como não existe apenas um composto de impacto para essas características, é importante o equilíbrio de centenas de compostos, em concentrações variando de  $10^{-1}\text{g.L}^{-1}$  a  $10^{-10}\text{g.L}^{-1}$  (Rapp & Mandery, 1986). Segundo Avakyants et al. (1981), o aroma do vinho deve-se, principalmente, a quatro ésteres: etil acetato, acetato de isoamila, etil hexanoato e etil octanoato, a dois álcoois: isobutil e isoamil álcoois, e ao aldeído acetaldeído. As demais substâncias voláteis atuam como modificadores do aroma primário fornecido por esses compostos. Parte das substâncias do aroma do vinho vem da uva (terpenos) e outras desenvolvem-se durante a fermentação.

Segundo Giudici et al. (1993), as leveduras, organismos indutores do “flavour” fermentativo, são responsáveis por grandes alterações nas propriedades químicas e sensoriais do vinho.

As jabuticabeiras são originárias do Brasil e apresentam dispersões naturais, sendo comumente encontradas nos quintais de casas, sítios e fazendas. Tornar o vinho de jabuticaba, cuja fabricação é extremamente caseira e oriunda da fermentação espontânea, uma atividade comercial, por meio de adaptações do processo de fabricação de vinhos, seria de extrema importância para evitar desperdícios da fruta, gerar lucros e valorizar a fruticultura do nosso país, além de preservar a espécie (Amaral, 2004).

Da mesma maneira que experimentos são realizados em vinificação de uva, obtendo-se um bom padrão para o vinho, é necessário ampliar o conhecimento sobre a vinificação de outras frutas, a fim de se obter um padrão de qualidade do produto fermentado. Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar o processo fermentativo de treze isolados de *Saccharomyces*, durante a microvinificação da jabuticaba-sabará (*Myrciaria jaboticaba*).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Leveduras

As 13 linhagens de leveduras de *Saccharomyces* utilizadas para a vinificação de laboratório foram: CA 1183, CA 116 e CA 1162, isoladas da fermentação natural de cana-de-açúcar, durante a produção de cachaça; CA 1184, CA 1185 e CA 1186, de vinificação oriundas da Itália; SA-1, CAT-1, VR-1, PE-2 e BG, isoladas da fermentação alcoólica de cana-de-açúcar, da indústria do álcool combustível (ESALQ); IZ 888 e CA 1187, linhagens isoladas da fermentação de uva, no Brasil.

A pureza desses microrganismos foi verificada pela análise das características morfológicas e microscópicas de colônias isoladas, obtidas em estrias compostas no meio YW (extrato de levedura, 3,0g.L<sup>-1</sup>; extrato de malte, 3,0g.L<sup>-1</sup>; peptona bacteriológica, 5,0g.L<sup>-1</sup>; glicose, 10,0g.L<sup>-1</sup> e ágar, 15,0g.L<sup>-1</sup>). As culturas estoques foram mantidas em freezer a -80°C.

### 4.2 Condições de crescimento das leveduras

As células de leveduras foram cultivadas em YEPG líquido (extrato de levedura, 10,0g.L<sup>-1</sup>; peptona bacteriológica, 10,0g.L<sup>-1</sup> e glicose, 20,0g.L<sup>-1</sup>). A incubação foi conduzida sob agitação de 150 rpm, em incubadora refrigeradora (“Shaker”) MA 830/A, à temperatura de 28°C.

### 4.3 Coleta das frutas

Os frutos de jaboticaba-sabará (*Myrciaria jaboticaba*) foram coletados no município de Lavras, MG, no mês de novembro de 2005. Os frutos, após



coleta, foram lavados, secos e prensados manualmente, obtendo-se uma polpa que foi congelada até sua utilização, a -18°C, em sacos plásticos.

#### **4.4 Preparo do mosto para a fermentação**

O mosto para a fermentação foi preparado a partir da polpa de jabuticaba, padronizada a 15 °Brix e autoclavada por 15 minutos, a 121°C. Frascos de 2 litros, contendo 1.800mL dessa polpa, foram utilizados nas microvinificações. Cada uma das treze fermentações foi realizada em triplicata.

#### **4.5 Padronização do inóculo e sua adaptação**

Uma densa suspensão de células foi preparada, a partir das culturas estoques, para cada uma das linhagens de leveduras utilizadas neste experimento. Assim, os pré-inóculos foram preparados em frascos Erlenmeyers de 125mL, contendo 60mL de mosto de jabuticaba, a 5°Brix, acrescidos de 1% de extrato de levedura. Os frascos foram incubados por, aproximadamente, 18 horas, sob agitação de 150 rpm, à temperatura de 28°C.

#### **4.6 Inoculação dos frascos para fermentação**

Aliquotas de 2mL do pré-inóculo foram inseridas em cada um dos três frascos, contendo 200mL de mosto de jabuticaba e acrescidos de 1% de extrato de levedura. Os frascos foram incubados a 28°C, sob agitação de 150 rpm, até a obtenção de uma concentração de  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Quando o número de células desejado foi atingido, inocularam-se, isoladamente, com os 200mL de inóculo de cada linhagem de levedura, os 1.800mL do mosto de jabuticaba, previamente autoclavados. Os frascos, em triplicata para cada linhagem, foram incubados a

22°C, em câmara de incubação BOD MOD 347 CD, até o final do processo fermentativo.

#### **4.7 Amostragem**

A primeira coleta, após a inoculação do mosto, ocorreu após 24 horas de fermentação. Novas amostragens aconteceram em intervalos periódicos de 24 horas, até o final da fermentação.

#### **4.8 Análises químicas e físicas**

O teor de sólidos solúveis (°Brix) foi verificado, em refratômetro digital (PALETE PR-32), para todas as amostras coletadas de cada linhagem.

Para verificar a velocidade de sedimentação das células, foram retiradas amostras das leveduras em fermentação e analisadas em espectrofotômetro, Micronal modelo - 442, a 600nm.

O teor de acidez titulável, em ácido cítrico, foi determinado para amostras “in natura” de polpa de jaboticaba utilizada para a fermentação, por titulação com hidróxido de sódio, a 0,1N (Instituto Adolfo Lutz, 1997).

O teor de açúcar residual foi determinado pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959), para todas as linhagens, na amostragem final das fermentações.

As amostras coletadas tiveram o pH aferido, em pHmetro Micronal B 474.

As amostras para cromatografia foram congeladas a -18°C, até o momento de suas análises.

#### **4.8.1 Determinação de proteína, umidade, extrato etéreo e cinzas**

As determinações de umidade, proteína, extrato etéreo e cinzas foram realizadas em triplicata.

O teor de umidade foi determinado pela desidratação, em estufa a 105°C, por 24 horas, de 10 gramas de amostra triturada em cápsula de porcelana. A umidade foi determinada pelas médias das diferenças de pesos, antes e depois da secagem e convertidas em porcentagem, de acordo com a AOAC (1990).

As amostras secas na determinação de umidade foram empregadas para extração dos lipídeos, com éter etílico, em aparelho tipo soxhlet, em refluxo por oito horas. O teor de extrato etéreo foi calculado pela diferença de peso do reboiler pesado antes e depois do refluxo, após evaporação do extrator e, relacionado com o peso da amostra úmida, empregada na determinação da umidade, seguindo a metodologia da AOAC (1990).

Os valores de proteína foram determinados pela análise do nitrogênio total, de acordo com o método de Kjeldahl, pela digestão de 0,1 grama de amostra, em ácido sulfúrico a 350°C; destilação em presença de ácido bórico e hidróxido de sódio e posterior titulação com ácido clorídrico 0,1N. O fator de multiplicação adotado foi 6,25 e a metodologia de acordo com Silva (1981).

A quantidade de resíduo mineral fixo (cinzas) foi determinada pela incineração de 1,5 grama de amostra, em mufla, a 550°C, por 12 horas. Antes de serem incineradas, as amostras foram pesadas em cadinhos, de massa conhecida e carbonizadas em chama protegida por tela de amianto, até não se verificar mais o desprendimento de fumaça. A quantidade de cinzas na amostra foi calculada pela média das diferenças de pesos antes e depois da utilização da mufla, relacionadas com o peso da amostra. A metodologia utilizada foi conforme as normas do Instituto Adolfo Lutz (1997).

A fração fibra representa o resíduo das substâncias das paredes celulares. O processo de Hennemberg consiste em uma digestão ácida, seguida

por uma básica. Com estes tratamentos, removem-se as proteínas, os açúcares e o amido, a hemicelulose e as pectinas, ficando, como resíduo, a celulose e a lignina insolúvel em ácido, além de material mineral. A diferença entre as duas etapas fornece o teor de fibra bruta, que varia em alimentos entre 0,5% a 15% (Silva, 1981).

#### **4.8.2 Análises cromatográficas: CG e HPLC**

O perfil de compostos voláteis foi determinado no cromatógrafo gasoso (CG-FID), pertencente ao Laboratório de Cromatografia da UFMG, sob orientação da professora Dra. Vany Ferraz). O cromatógrafo a gás utilizado foi da marca Varian, modelo CP-3380, equipado com detector de ionização de chamas. As amostras do fermentado, previamente centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 minutos e a 5.000 rpm, por 20 minutos, foram filtradas, em filtro milipore, de 0,45µm e diluídas em água Milli-Q. Essas amostras foram injetadas (1µL) nas seguintes condições de operação: detector FID e injetor operando a 280°C, coluna capilar HP-FFAP de 25m de comprimento, por 0,20mm de diâmetro interno, da marca Agilent, operando em gradiente de temperatura, inicialmente, a 60°C e elevação de 8°C.min<sup>-1</sup> até chegar a 240°C. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio, com fluxo de 2,0mL. min<sup>-1</sup> e o split foi de 1:100.

Os açúcares redutores glicose e frutose, o açúcar não redutor sacarose e os ácidos orgânicos acético, málico, succínico, cítrico, fórmico, maleico, malônico, benzóico e oxálico foram determinados no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do DBI/UFLA, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se o cromatógrafo da marca Shimadzu, com detector de UV, equipado: a) para açúcares, com coluna Shim-pack NH<sub>2</sub> (Shimadzu), de 4,6 mm ID x 15 cm. A detecção foi por índice de refração e a temperatura do

forno, de 40°C. A fase móvel utilizada foi acetonitrila/H<sub>2</sub>O (80:20), com um fluxo de 1mL por minuto; b) para ácidos, com coluna Shim-pack SCR (Shimadzu), de 7,9mm ID x 30cm. A detecção foi por UV (210nm) e a temperatura utilizada no forno foi de 40°C. A fase móvel utilizada foi o ácido ortofosfórico, a 1%, com fluxo de 0,6mL.min.<sup>-1</sup>.

Os experimentos foram estruturados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com análise das amostras em triplicata e os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo programa SISVAR (Ferreira, 2000).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Proteína, umidade, extrato etéreo e cinzas da jaboticaba

Os valores médios dos dados obtidos, em triplicata, da caracterização físico-química da polpa de jaboticaba-sabará (*Myrciaria jaboticaba*), “in natura” e após a autoclavagem a 121°C, por 15 minutos, encontram-se na Tabela 2.

**TABELA 2** Valores médios da composição centesimal da polpa de jaboticaba-sabará, do município de Lavras, MG, utilizada no presente trabalho.

Composição centesimal	%
Umidade	86,72
Matéria seca	13,28
Proteína	3,67
Nitrogênio	0,59
Gordura	0
Resíduo mineral fixo	13,99
Fibra bruta	0,20

O valor médio de 3,67% encontrado para as proteínas da jaboticaba foi bem superior ao valor médio encontrado por Amaral (2004), que encontrou 0,49%, em jaboticaba do município de Brumadinho, MG. Esta autora também encontrou valor médio para fibra bruta de 0,095%, inferior ao encontrado neste trabalho. Esses dados confirmaram a afirmativa de que os frutos *Myrciaria jaboticaba* podem apresentar variação na sua composição centesimal, dependendo das condições de seu cultivo.

A polpa de jaboticaba apresentou o valor de pH 3,6, sendo caracterizada como fruta ácida. Esse valor é concordante com Amaral (2004), que encontrou

dados semelhantes, ao caracterizar a jabuticaba, o qual foi de 3,7. Outras frutas também apresentaram pH semelhantes: Corazza et al. (2001), investigando a microvinificação da laranja, encontraram pH 3,64 para a fruta e Dias et al. (2003), caracterizando a polpa de cajá, encontraram pH 3,3.

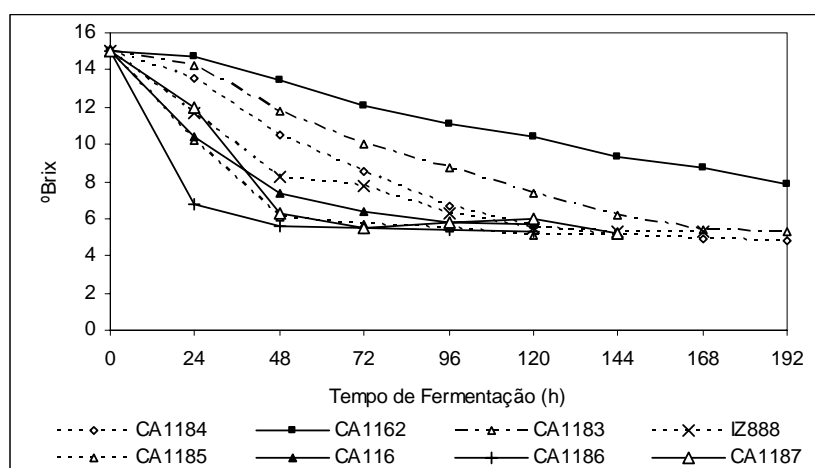
O valor obtido para a acidez total titulável, baseada na concentração de ácido cítrico, no mosto de jabuticaba, para a microvinificação, foi de 1,49%. Esse resultado concorda com Oliveira et al. (2003), que caracterizaram diversas jabuticabas-sabará, provenientes de diferentes regiões de cultivo do estado de São Paulo, encontrando a acidez total titulável variando de 0,888g a 1,652g, de ácido cítrico, por 100g de polpa analisada.

Todas as linhagens utilizadas nas fermentações foram capazes de fermentar a polpa de jabuticaba, de 13,5 °Brix e padronizada a 15,0 °Brix, na vinificação de laboratório. Os dados obtidos e representados nas Figuras 8 e 9 mostram o comportamento das linhagens do laboratório e industriais, respectivamente, em relação ao consumo dos açúcares (°Brix), em função do tempo de fermentação, a 22°C.

A variação do °Brix com o tempo de fermentação ocorreu em duas fases distintas, nos experimentos realizados (Figuras 8 e 9). Nas primeiras 48 horas, a fermentação foi tumultuosa, com desprendimento de CO<sub>2</sub> e rápido consumo do açúcar do mosto, existindo elevada atividade metabólica dos microrganismos. Numa segunda fase, menos agitada, observou-se menor atividade das leveduras. Essas variações, descendentes do °Brix, coincidiram com a diminuição da intensidade de borbulhamento do dióxido de carbono, no frasco fermentador. Também foi observado que, no final da fermentação, o valor de °Brix se manteve entre os valores de 4 a 6. Esse resíduo, provavelmente, foi devido aos açúcares não fermentescíveis, no mosto de jabuticaba e de açúcares residuais, da microvinificação. Corazza et al. (2000), pesquisando a caracterização do vinho caseiro, de laranja, encontraram o grau Brix final próximo a oito, indicando,

assim, a quantidade de açúcares não fermentescíveis da laranja. Segundo os autores, o final da fermentação somente foi conseguido com 80 horas, ocorrendo uma fermentação tumultuosa, no início, entre 28 e 30 horas.

O comportamento das linhagens, do laboratório de pesquisa, de *Saccharomyces*, em relação ao consumo de sólidos solúveis (°Brix), durante a fermentação do mosto de jabuticaba, está representado na Figura 8. A estabilização da fermentação e o final do consumo de açúcares foram omitidos para a linhagem CA 1162, que estabilizou com 336 horas.



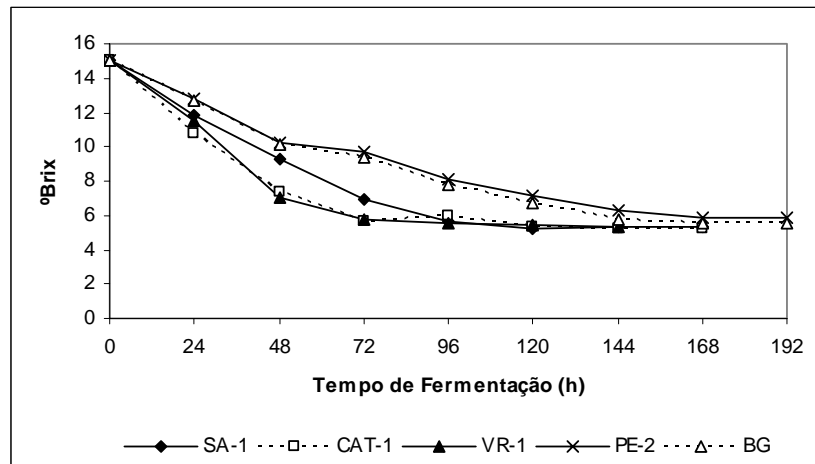
**FIGURA 8** Comportamento das linhagens de *Saccharomyces*, do laboratório, em relação ao consumo de sólidos solúveis (°Brix), durante a fermentação do mosto de jabuticaba. Os dados apresentados são valores médios de três repetições.

Na Figura 8, pôde-se observar que as linhagens CA 1184 e CA 1183 finalizaram a fermentação com 168 horas, a linhagem CA 1162 apresentou uma queda gradual de grau Brix, a linhagem CA 1185 apresentou queda de 60% do



grau Brix, em 48 horas de fermentação e o final desse processo de fermentação foi alcançado com 96 horas. A linhagem IZ 888 apresentou o consumo de 50% do açúcar do mosto em 96 horas e o final dessa fermentação somente ocorreu às 120 horas, a linhagem CA 116 consumiu 49% do açúcar do mosto em, aproximadamente, 48 horas de fermentação e a estabilização do sistema, com o final da fermentação, ocorreu com 120 horas. A linhagem CA 1187 consumiu 60% do açúcar do mosto, em 48 horas e o final dessa fermentação foi com 72 horas e a linhagem CA 1186 consumiu 50% do açúcar do mosto, em 24 horas e estabilizou o sistema de fermentação com 48 horas.

O comportamento das linhagens industriais de *Saccharomyces*, em relação ao consumo de sólidos solúveis (°Brix), durante a fermentação do mosto de jabuticaba, está descrito na Figura 9. Com a linhagem SA-1 houve a queda de 50% do grau °Brix, em 72 horas e o final da fermentação ocorreu aos 5 dias. As linhagens VR-1 e CAT-1 apresentaram comportamentos semelhantes, havendo queda acentuada do °Brix, com 48 horas de fermentação e o final do processo fermentativo ocorreu em 96 horas. O consumo de açúcar apresentado pela linhagem PE-2 foi lento e o final da fermentação ocorreu às 168 horas. A levedura BG apresentou consumo de 50% do açúcar do mosto de jabuticaba, em 120 horas de fermentação, com finalização do processo fermentativo somente aos 6 dias.



**FIGURA 9** Comportamento das linhagens de *Saccharomyces*, da indústria do álcool, em relação ao consumo de sólidos solúveis (°Brix), durante a fermentação do mosto de jabuticaba. Os dados apresentados são valores médios de três repetições.

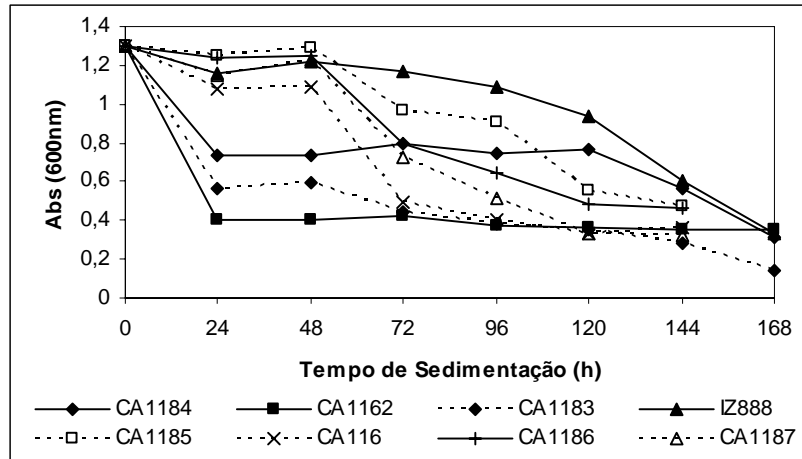
O final do processo fermentativo, mais rápido, indicado pela estabilização do °Brix, ocorreu com a linhagem híbrida CA 1186. Com 24 horas, houve o consumo de 50% dos açúcares e, com 48 horas, o °Brix já estava estabilizado, indicando o final da fermentação. Um grupo de linhagens ficou intermediário na avaliação do período de fermentação, alcançando a estabilização entre 96 e 120 horas: CA 116, SA-1, VR-1, CAT-1 e CA 1185. A linhagem CA 1187 alcançou a estabilização com 72 horas de fermentação. As leveduras que alcançaram o final de fermentação com maior tempo, entre 120 e 168 horas, foram IZ 888 (120h), BG (144h), CA 1184 (168h), CA 1183 (168h), PE-2 (168h).

Segundo Ough (1992), a estabilização do °Brix indica o final do processo fermentativo. A linhagem CA 1162 apresentou o consumo mais lento de sólidos solúveis dentre todas as linhagens analisadas, indicando um lento

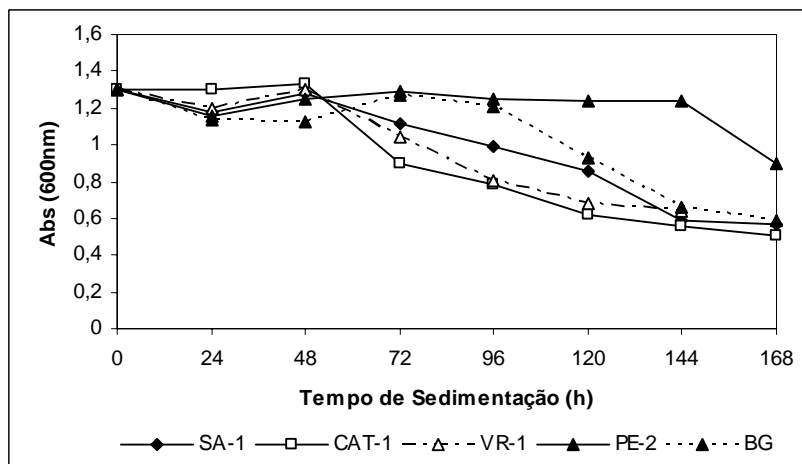
metabolismo, prolongando a fermentação por até 336 horas. Amaral (2004), pesquisando a fermentação da linhagem CA 1162, em mosto de jabuticaba, também verificou que a levedura foi bastante lenta, sendo necessárias 192 horas para atingir o final da fermentação.

A Figura 10 ilustra a velocidade de sedimentação de oito linhagens *Saccharomyces* testadas. A sedimentação mais rápida, nas primeiras 48 horas, ocorreu com as linhagens CA 1184, CA 1183 e CA 1162. Para as linhagens CA 1183 e CA 1162, esse comportamento é vantajoso, pois são utilizadas na fermentação da cachaça, facilitando o processo de fabricação. As linhagens que permaneceram maior tempo no meio de fermentação, portanto com baixa velocidade de sedimentação, foram IZ 888 e CA 1185. O comportamento apresentado pela linhagem IZ 888 é interessante, pois essa levedura é utilizada na fermentação de uva, na qual não é necessária a floculação. As sedimentações das linhagens CA 1162, CA 1184 e CA 1183 não estão totalmente representadas nessa Figura, a linhagem CA 1162 continuou a fermentação até 336 horas, CA 1184 até 240 horas e CA 1183 até 192 horas.

Os dados obtidos e representados na Figura 11 mostram a velocidade de sedimentação de 5 linhagens, isoladas da fermentação de álcool combustível. Neste processo de produção de álcool combustível, após a fermentação, as leveduras são centrifugadas e, depois, reutilizadas. Assim, a característica de sedimentação rápida não é um fator importante para essas indústrias. Neste trabalho, a sedimentação mais pronunciada ocorreu depois de 60 horas. A linhagem com menores velocidades de sedimentação foi PE-2, seguida de BG. As sedimentações das linhagens PE-2 e BG estão representadas parcialmente na Figura 11, pois elas continuaram a sedimentação até 192 horas.



**FIGURA 10** Sedimentação das linhagens *Saccharomyces*, do laboratório, durante a fermentação do mosto de jabuticaba. Os dados apresentados são valores médios de três repetições.



**FIGURA 11** Sedimentação das linhagens *Saccharomyces*, da indústria, durante a fermentação do mosto de jabuticaba. Os dados apresentados são valores médios de três repetições.

Algumas linhagens testadas neste trabalho permaneceram maior tempo no meio de fermentação, portanto, com menor velocidade de sedimentação. As variações entre as linhagens, para os valores obtidos de sedimentação, podem ser explicadas pela formação de flocos de diferentes tamanhos e conseqüente sedimentação, com tempos próprios. De acordo com Amoury et al. (1988), o melhor método para medir floculação seria a medida direta da sua taxa, entretanto, é difícil, em virtude de ocorrerem os dois fenômenos em conjunto, floculação e sedimentação. Woof (1962) já havia constatado, pela análise de curvas de sedimentação de leveduras de cervejaria, sob efeito da floculação, que a sedimentação é devido à distribuição do tamanho dos flocos em suspensão.

Para o fermentado de jaboticaba é interessante que as leveduras permaneçam mais tempo no meio fermentativo. Da mesma maneira que ocorre com o vinho, o fermentado necessita de substâncias do metabolismo secundário, das leveduras, incorporadas à bebida. A sedimentação mais lenta da levedura parece propiciar essa maior produção. De acordo com esse parâmetro, as seguintes linhagens são indicadas para o fermentado de jaboticaba: IZ 888, CA 1185, CA 1186, CA 1184, PE-2, SA-1, BG, CAT-1 e VR-1.

## **5.2 Açúcares totais, açúcares redutores e açúcares não redutores**

A concentração de açúcar total pesquisada, no mosto inicial, para a microvinificação da jaboticaba, foi de 16,83 gramas, para 100 gramas de mosto. Amaral (2004), pesquisando jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*), de Brumadinho, MG, encontrou resultado semelhante, na faixa de 17%, evidenciando, em ambos os casos, o potencial da fruta para a utilização em indústrias alimentícias.

Na presente pesquisa, a concentração analisada de açúcar redutor total, no mosto inicial para a microvinificação, foi de 13,37 gramas, para 100 gramas

de mosto. A concentração analisada de açúcar não redutor total, no mosto inicial para a microvinificação, foi de 1,87 gramas para 100 gramas de mosto.

Os dados obtidos dos resíduos de açúcares redutores totais são mostrados na Tabela 3, baseados em glicose, pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), após a completa microvinificação, realizada pelas linhagens de levedura *Saccharomyces*, no mosto de jabuticaba. A maior concentração de açúcar residual ocorreu na fermentação realizada pela linhagem CA 1187 e a menor concentração residual foi detectada nas microvinificações realizadas pelas linhagens CA 1184, CA 1162 e CA 1183.

De acordo com os parâmetros propostos por Alexandre & Charpentier (1998), as microvinificações realizadas foram completas, pois o açúcar residual permaneceu na faixa de  $2\text{g.L}^{-1}$  a  $4\text{g.L}^{-1}$ .

O método do DNS, provavelmente, serviu para quantificar todos açúcares redutores presentes na microvinificação da jabuticaba, pois os valores médios obtidos aqui superam os valores médios de glicose residual obtidos por HPLC.

**TABELA 3** Valores de açúcares redutores totais, em glicose residual, DNS, após a microvinificação

Levedura	A.R. (Gli.) (g/100g)	Levedura	A. R.(Gli.) (g/100g)
IZ 888	0,27 <sup>b</sup>	CAT - 1	0,18 <sup>c</sup>
CA 1187	0,42 <sup>a</sup>	VR -1	0,20 <sup>c</sup>
CA 1184	0,09 <sup>d</sup>	PE-2	0,33 <sup>b</sup>
CA 1183	0,14 <sup>d</sup>	SA-1	0,18 <sup>c</sup>
CA 116	0,30 <sup>b</sup>	BG	0,32 <sup>b</sup>
CA 1186	0,23 <sup>c</sup>	CA 1162	0,15 <sup>d</sup>
CA 1185	0,24 <sup>c</sup>		

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si ( $P > 0,05$ ), pelo teste de Scott-Knott. A.R. (Gli) = açúcar redutor total, em glicose residual

A determinação de açúcares e de ácidos orgânicos em alimentos é muito importante, pois suas presenças e concentrações relativas podem afetar as características sensoriais do produto da fermentação, fornecendo parâmetros para a otimização do processo tecnológico.

A análise do mosto, por HPLC, neste trabalho, foi realizada para quantificar os açúcares sacarose, frutose e glicose, supostamente os principais açúcares presentes no mosto de jabuticaba. Os três açúcares corresponderam a 91,20 gramas por litro do mosto.

No presente trabalho, a sacarose foi quantificada, no processo fermentativo, em 1,23 grama, para 100mL de mosto inicial. Os açúcares frutose e glicose foram quantificados durante toda a microvinificação e os dados obtidos estão representados nas Tabelas 4 e 5.

Na análise de frutose da Tabela 4, verificou-se efeito significativo ( $P < 5$ ) dos tratamentos sobre essa variável. Com 24 horas de fermentação, o consumo mais elevado de frutose ocorreu com a fermentação do mosto pelas leveduras CA 1183 e CA 1162. Em média, o consumo ficou próximo a 25%, para as linhagens analisadas. As leveduras consumiram, aproximadamente, 96% de frutose, considerando todo o período da microvinificação.

**TABELA 4** Valores médios, com seus respectivos desvios-padrão, obtidos por HPLC, das concentrações de frutose ( $\text{g}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ ), durante a microvinificação da jabuticaba.

Linhagens	Fermentação		
	Inicial	24 h	Final*
CA 1184	2,3	1,8 <sup>a</sup>	0,1
CA 1162	2,3	0,2 <sup>c</sup>	0,0
CA 1183	2,3	0,2 <sup>c</sup>	0,1
SA-1	2,3	1,5 <sup>a</sup>	0,0
CAT – 1	2,3	1,3 <sup>a</sup>	0,0
VR – 1	2,3	1,7 <sup>a</sup>	0,1
PE-2	2,3	1,8 <sup>a</sup>	0,1
BG	2,3	1,8 <sup>a</sup>	0,1
IZ 888	2,3	1,2 <sup>a</sup>	0,2
CA 1185	2,3	1,6 <sup>a</sup>	0,0
CA 116	2,3	1,7 <sup>a</sup>	0,1
CA 1186	2,3	0,9 <sup>b</sup>	0,1
CA 1187	2,3	1,5 <sup>a</sup>	0,1

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. \* Efeito não significativo ( $P > 0,05$ ) pelo teste de Scott-Knott.

Na análise de glicose da Tabela 5, verificou-se efeito significativo ( $P < 5$ ) dos tratamentos sobre essa variável. Com 24 horas de fermentação, o consumo mais elevado de glicose ocorreu com a fermentação do mosto pelas leveduras CA 1183 e CA 1162. Em média, o consumo ficou em torno de 35%, para todas as linhagens. As leveduras consumiram praticamente toda a glicose do meio, aproximadamente 99%, considerando todo o período da microvinificação.



**TABELA 5** Valores médios com seus respectivos desvios-padrão, obtidos por HPLC, das concentrações de glicose ( $\text{g}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ ), durante a microvinificação da jabuticaba.

Linhagens	Fermentação		
	Inicial	24 h	Final*
CA 1184	5,6	4,6 <sup>a</sup>	0,2
CA 1162	5,6	0,7 <sup>c</sup>	0,1
CA 1183	5,6	0,5 <sup>c</sup>	0,0
SA-1	5,6	3,2 <sup>a</sup>	0,0
CAT – 1	5,6	2,3 <sup>b</sup>	0,0
VR – 1	5,6	3,8 <sup>a</sup>	0,1
PE-2	5,6	4,4 <sup>a</sup>	0,2
BG	5,6	4,3 <sup>a</sup>	0,1
IZ 888	5,6	3,0 <sup>a</sup>	0,1
CA 1185	5,6	3,6 <sup>a</sup>	0,0
CA 116	5,6	3,6 <sup>a</sup>	0,2
CA 1186	5,6	3,4 <sup>a</sup>	0,0
CA 1187	5,6	3,8 <sup>a</sup>	0,2

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ( $P > 0,05$ ), pelo teste de Scott-Knott . \* Efeito não significativo ( $P > 0,05$ ) pelo teste de Scott-Knott.

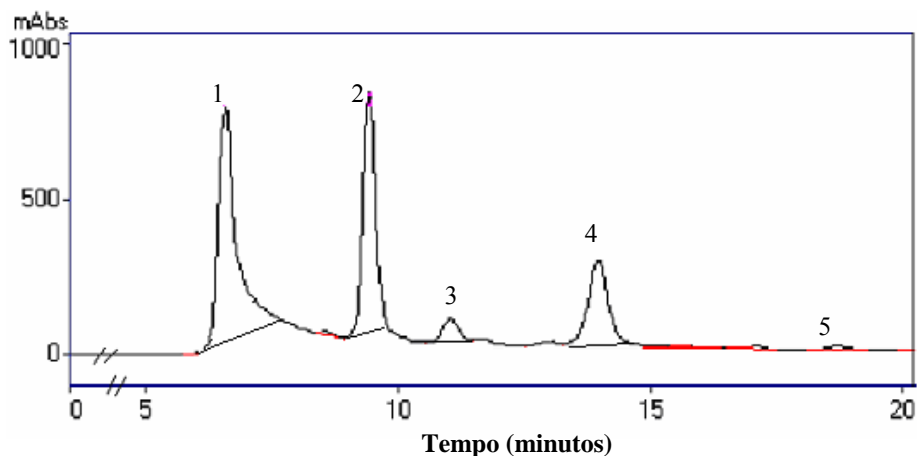
Pela análise dos valores médios obtidos (Tabelas 4 e 5) pôde-se observar que as leveduras consumiram a glicose preferencialmente, pois, em 24 horas de fermentação, foram consumidos, aproximadamente, 10% a mais de glicose do que frutose. Essa co-fermentação foi avalizada por Berthels et al. (2004), que constataram o consumo concomitante dos dois açúcares, durante a fermentação de 17 linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em mosto de uva.

Os dados obtidos e apresentados nas Tabelas 4 e 5 indicam também a presença de resíduo de frutose e de glicose. Essa observação foi compartilhada por Berthels et al. (2004), que obtiveram dados semelhantes em seus experimentos.

A facilidade com que os ácidos orgânicos penetram ou saem da célula de levedura depende de sua natureza lipofílica, a qual cresce, geralmente, com o tamanho da cadeia e com o grau de ramificação. Ácidos de cadeias carbônicas pequenas e com pouca ramificação transitam mais facilmente.

A maior concentração encontrada para ácidos orgânicos, na microvinificação da jabuticaba, foi a de ácido cítrico (Tabelas 6, 7 e 8). Assim, a dosagem de acidez total titulável, normalmente, é baseada na concentração de ácido cítrico. A concentração encontrada nesta microvinificação foi 1,39 grama de ácido, para 100mL de mosto, com consumo do ácido cítrico durante a microvinificação. Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) na degradação do ácido cítrico, nas fermentações pelas 13 linhagens de levedura.

Um cromatograma típico obtido da análise dos ácidos orgânicos, da microvinificação da jabuticaba, encontra-se na Figura 12.



**FIGURA 12** Cromatograma obtido por HPLC, na análise de ácidos orgânicos, de uma amostra da microvinificação da jabuticaba. Picos em evidência: 1-ácido benzóico; 2-ácido cítrico; 3-ácido málico; 4-ácido succínico; e 5-ácido acético.

O ácido ortofosfórico, a 1%, foi o eluente para a separação dos ácidos, pois proporcionou maior estabilização da linha de base e com baixo ruído. Essa verificação foi compartilhada por Chinnici et al. (2005), que optaram pelo mesmo ácido de arraste.

O ácido cítrico foi o ácido predominante nas amostras de jabuticaba, sendo utilizado como referência na dosagem da acidez total titulável, em jabuticabas. A concentração desse ácido talvez tenha sido adicionada de ácido tartárico, se presente na amostra. O tempo de retenção do ácido cítrico e do ácido tartárico foram próximos e, devido à alta concentração do ácido cítrico na amostra, o seu pico, no cromatograma, pode ter arrastado com ele o ácido tartárico. Kotani et al. (2004) analisaram ácidos orgânicos em vinhos de uva e fermentados de laranja, por HPLC, não conseguindo a separação cromatográfica entre o ácido cítrico e o tartárico, mesmo otimizando o método de HPLC-UV.

Os ácidos fumárico e láctico apresentaram o mesmo tempo de retenção, na coluna utilizada. Se presentes nas amostras, ficaram desaparecidos, devido à concentração do ácido succínico, de tempo de retenção semelhante.

Nas Tabelas 6, 7 e 8 são apresentados os dados obtidos das concentrações ácidas de alguns compostos, das amostras de jabuticaba, que foram analisadas, por HPLC. Os valores das concentrações iniciais são apresentados em grama por 100mL de mosto e depois são indicados os valores médios obtidos para as microvinificações, em triplicata, em grama por 100mL de fermentado, provenientes das fermentações das treze linhagens de leveduras de *Saccharomyces*.

**TABELA 6** Valores médios obtidos, por HPLC, das concentrações de alguns ácidos orgânicos ( $\text{g}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ ), presentes na microvinificação da jabuticaba.

Ácido	Ferm	Levedura			
		CA 1184	CA 1162	CA 1183	SA-1
Acético	Inicial	0,01	0,01	0,01	0,01
	24h	0,009b	0,007c	0,007c	0,01a
	Tf*	0,008	0,007	0,007	0,008
Benzóico	Inicial	1,24	1,24	1,24	1,24
	24h*	1,08	0,94	1,05	1,19
	Tf	0,21c	0,86b	0,59c	1,01a
Cítrico	Inicial	1,39	1,39	1,39	1,39
	24h*	1,16	1,25	1,07	1,25
	Tf*	0,92	1,23	1,04	1,18
Málico	Inicial	0,09	0,09	0,09	0,09
	24h*	0,07	0,06	0,07	0,07
	Tf*	0,05	0,06	0,04	0,06
Malônico	Inicial	0,21	0,21	0,21	0,21
	24h	0,10B	0,17A	0,20A	0,18A
	Tf	0,05d	0,15b	0,11c	0,04d
Oxálico	Inicial	0,02	0,02	0,02	0,02
	24h	0,02B	0,03A	0,03A	0,02B
	Tf	0,03b	0,03b	0,03b	0,03b
Succínico	Inicial	0,92	0,92	0,92	0,92
	24h*	0,82	0,65	0,85	0,72
	Tf	0,99b	0,93b	0,94b	0,96b

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ( $P > 0,05$ ), pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, considerando as Tabelas 6, 7 e 8. \* Valores médios sem diferenças significativas ( $P > 0,05$ ), pelo teste de Scott-Knott. Ferm: fermentação.

Tf = tempo final de fermentação (CA 1184= 240h, VR-1= 144h, CA 116= 144h, CA 1162= 336h, PE-2= 192h, CA 1186= 144h, CA 1183= 192h, BG= 192h, CA 1187= 144h, SA-1= 168h, IZ 888= 168h, CAT-1= 168h, CA 1185= 144h).

**TABELA 7** Valores médios obtidos, por HPLC, das concentrações de alguns ácidos orgânicos (g.100mL<sup>-1</sup>), presentes na microvinificação da jabuticaba.

Ácido	Ferm.	Levedura			
		CAT-1	VR-1	PE-2	BG
Acético	Inicial	0,01	0,01	0,01	0,01
	24h	0,01a	0,01a	0,01b	0,01b
	Tf*	0,008	0,010	0,009	0,009
Benzóico	Inicial	1,24	1,24	1,24	1,24
	24h*	1,22	1,00	1,20	1,22
	Tf	1,10a	0,95a	1,15a	1,10a
Cítrico	Inicial	1,39	1,39	1,39	1,39
	24h*	1,27	1,13	1,21	1,18
	Tf*	1,21	1,12	1,06	1,17
Málico	Inicial	0,09	0,09	0,09	0,09
	24h*	0,07	0,06	0,06	0,05
	Tf*	0,05	0,06	0,04	0,05
Malônico	Inicial	0,21	0,21	0,21	0,21
	24h	0,19A	0,20A	0,19A	0,17A
	Tf	0,04d	0,19a	0,05d	0,05d
Oxálico	Inicial	0,02	0,02	0,02	0,02
	24h	0,03A	0,03A	0,03A	0,04A
	Tf	0,04a	0,03b	0,04a	0,03b
Succínico	Inicial	0,92	0,92	0,92	0,92
	24h*	0,80	0,70	0,77	0,74
	Tf	1,26a	0,89b	1,29a	1,02b

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ( $P > 0,05$ ), pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, considerando as Tabelas 6, 7 e 8.

\* Valores sem diferenças significativas ( $P > 0,05$ ), pelo teste de Scott-Knott.

Ferm: fermentação.

Tf = tempo final de fermentação (CA 1184= 240h, VR-1= 144h, CA 116= 144h, CA 1162= 336h, PE-2= 192h, CA 1186= 144h, CA 1183= 192h, BG= 192h, CA 1187= 144h, SA-1= 168h, IZ 888= 168h, CAT-1= 168h, CA 1185= 144h).

**TABELA 8** Valores médios obtidos, por HPLC, das concentrações de alguns ácidos orgânicos (g.100mL<sup>-1</sup>), presentes na microvinificação da jabuticaba.

Ácido	Fer.	Levedura				
		IZ 888	CA 1185	CA 116	CA 1186	CA 1187
Acético	I	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
	24h	0,009b	0,008b	0,009b	0,009b	0,009b
	Tf*	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
Benz.	I	1,24	1,24	1,24	1,24	1,24
	24h*	1,18	1,23	1,22	1,16	1,20
	Tf	1,03a	1,22a	1,09a	1,07a	1,04a
Cítrico	I	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39
	24h*	1,15	1,23	1,05	1,21	1,28
	Tf*	1,14	1,18	1,05	1,15	1,17
Málico	I	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
	24h*	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07
	Tf*	0,05	0,06	0,06	0,05	0,06
Malon.	I	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21
	24h	0,19A	0,19A	0,19A	0,20A	0,19A
	Tf	0,06d	0,18a	0,16b	0,19a	0,14b
Oxálico	I	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
	24h	0,03A	0,03A	0,02B	0,02B	0,02B
	Tf	0,03b	0,03b	0,03b	0,03b	0,02b
Succ.	I	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92
	24h*	0,74	0,85	0,62	0,87	0,87
	Tf	0,89b	1,12a	1,00b	1,16a	0,95b

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ( $P > 0,05$ ), pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, considerando as Tabelas 6, 7 e 8.

\* Valores médios sem diferenças significativas ( $P > 0,05$ ), pelo teste de Scott-Knott. Fer.: fermentação; I: inicial; Benz.: benzóico; Malon: malônico; Succ.: succínico.

Tf = tempo final de fermentação (CA 1184= 240h, VR-1= 144h, CA 116= 144h, CA 1162= 336h, PE-2= 192h, CA 1186= 144h, CA 1183= 192h, BG= 192h, CA 1187= 144h, SA-1= 168h, IZ 888= 168h, CAT-1= 168h, CA 1185= 144h).

Pela análise dos valores médios obtidos (Tabelas 6, 7 e 8) pôde-se observar que o ácido succínico foi encontrado na concentração de 0,92 grama para 100mL de mosto de jabuticaba. Sua concentração foi aumentada, durante a fermentação do mosto, por todas as leveduras; as linhagens PE-2, CAT-1, CA 1186 e CA 1185 produziram a maior quantidade desses ácidos. O ácido málico, que estava 0,09 grama para 100mL do mosto de jabuticaba, apresentou decréscimo de, aproximadamente, 50%, na sua concentração, durante a fermentação. O ácido benzóico sofreu decréscimo bem menor, com consumo variável entre as leveduras analisadas. O ácido malônico foi consumido em quantidades variadas pelas leveduras, durante a fermentação do mosto.

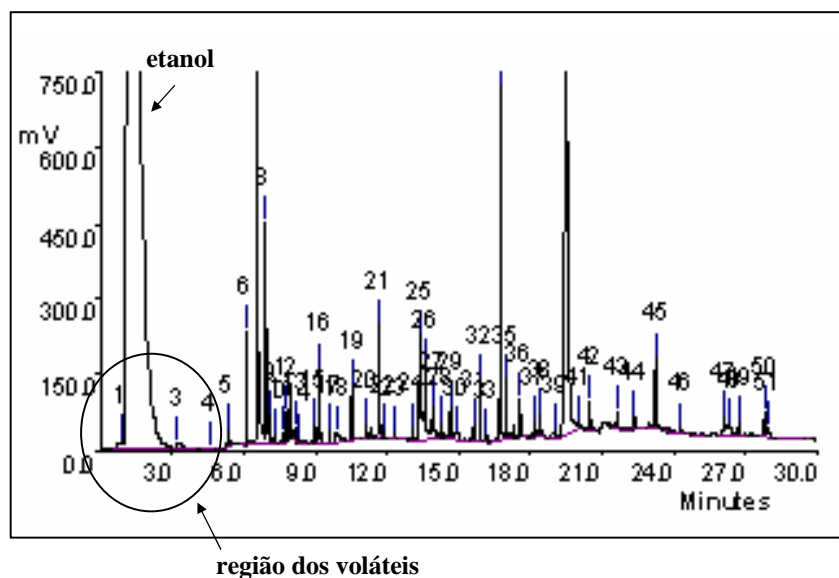
Os perfis dos ácidos foram idênticos para as linhagens do laboratório e para as linhagens industriais. Assim, foi possível observar as variações nas concentrações dos ácidos encontrados em quantidades mais elevadas, durante a microvinificação da jabuticaba. Esse padrão foi, aproximadamente, idêntico em todas as linhagens investigadas.

As análises da vinificação da jabuticaba são, praticamente, inéditas e a dosagem dos componentes voláteis é de difícil execução. Ainda não se desenvolveu um método adequado para as análises, por GC, do mosto ou do fermentado da jabuticaba. Para o caju, Garruti et al. (2002) afirmam que já ter sido desenvolvido um método de análise, por GC. Entretanto, para a jabuticaba, o mosto analisado apresentou vários compostos de baixíssimas concentrações e, sobrepostos, impediram suas quantificações.

Os compostos voláteis da microvinificação da jabuticaba, de baixo peso molecular, são os primeiros a serem eluídos no cromatograma (Figuras 13 e 14). Dentre esses compostos, está o etanol, composto volátil majoritário, da microvinificação. A alta concentração do etanol, na vinificação da jabuticaba, arrastou todos os outros compostos, impedindo suas detecções e dosagens. Na falta de um método, para quantificar os compostos da vinificação da jabuticaba,

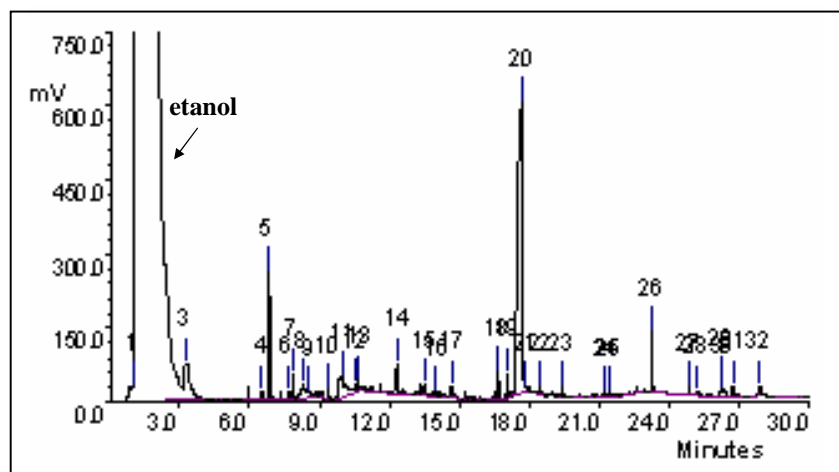
ou dosa apenas o etanol ou se trabalha com o perfil de alguns compostos. Para dosar o etanol, com precisão, deve-se diminuir a amostragem e a sensibilidade do aparelho, desaparecendo todos os outros compostos (Ferraz, 2006 - comunicação pessoal).

Amaral (2004) também encontrou esse mesmo problema, na dosagem do fermentado de jabuticaba, por GC. A autora conseguiu dosar apenas um composto volátil, sendo identificado como álcool isoamílico.



**FIGURA 13** Cromatograma obtido, por GC, de compostos presentes na microvinificação da jabuticaba, após 24 horas de fermentação.





**FIGURA 14** Cromatograma obtido, por GC, de compostos presentes na microvinificação da jaboticaba, após a fermentação.

Os valores obtidos e representados na Tabela 9 mostram as concentrações do etanol, quantificado por GC, durante a microvinificação da jaboticaba.

A concentração (%) mais elevada do etanol, nas primeiras 24 horas de fermentação, foi conseguida pela linhagem CA 1185 (2,86%, v/v). A produção final mais elevada do álcool foi realizada pela linhagem de *Saccharomyces* CA 1162, a qual foi de 10,07% (v/v) e a menos elevada foi da microvinificação por CA 1186, a qual foi de 7,68% (v/v).

**TABELA 9** Concentração do etanol, obtida por GC, em % (v/v), produzido pelas treze *Saccharomyces*, durante a microvinificação da jabuticaba.

Linhagem	Tempo de fermentação	
	24 h	Tf*
CA 1183	0,68	8,90
CA 116	0,98	8,05
CA 1162	0,19	10,07
CA 1184	0,72	8,57
CA 1185	2,86	7,84
CA 1186	2,74	7,68
CA 1187	1,48	8,10
SA-1	2,13	8,72
CAT-1	2,36	9,21
VR-1	2,41	8,61
PE-2	1,44	7,85
BG	1,40	8,26
IZ 888	2,42	8,35

\*Tf = tempo final de fermentação (CA 1184= 240h, VR-1= 144h, CA 116= 144h, CA 1162= 336h, PE-2= 192h, CA 1186= 144h, CA 1183= 192h, BG= 192h, CA 1187= 144h, SA-1= 168h, IZ 888= 168h, CAT-1= 168h, CA 1185= 144h).

As duas linhagens com melhores desempenhos, nas análises de estresses, não mantiveram a mesma performance, durante a microvinificação da jabuticaba. A linhagem CA 1186 não foi resistente à concentração de KCl 1,0M e produziu a menor concentração de álcool durante a fermentação. Essa linhagem, não é viável, portanto, para a produção do fermentado de jabuticaba. Entretanto, a linhagem CA 1162 mostrou-se resistente aos vários estresses e foi a levedura que mais produziu álcool. Sua baixa resistência ao etanol, a 12%, não afetou sua performance, pois, sua produção alcoólica ficou em torno de 10%. O maior tempo gasto para finalizar a fermentação, não está em desacordo com os procedimentos realizados, atualmente, para a produção do fermentado de

jaboticaba. Os dados obtidos dessas análises indicaram a linhagem CA 1162 como a levedura própria para a vinificação em maior escala, acompanhada, certamente, de testes do aroma da bebida fermentada de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*).

## 6 CONCLUSÕES

Todas as linhagens de leveduras *Saccharomyces* analisadas foram capazes de fermentar o mosto de jabuticaba, finalizando a microvinificação com estabilidade do °Brix.

Nas primeiras 48 horas, houve fermentação tumultuosa, com bastante produção de gás e com rápido consumo de açúcar do mosto e, na segunda fase, entre 48 e 336 horas, dependendo da linhagem, houve menor atividade dos microrganismos.

Os açúcares frutose e glicose foram consumidos por todas as leveduras, durante a microvinificação da jabuticaba.

As concentrações dos ácidos cítrico, benzóico, málico e malônico decresceram com a microvinificação e a concentração do ácido succínico cresceu.

O composto volátil majoritário, verificado nas análises dos voláteis da microvinificação da jabuticaba, por GC, foi o etanol, cuja concentração mais elevada foi de 10,07% (v/v), obtida pela linhagem CA 1162.

A linhagem de *Saccharomyces* com melhor performance na vinificação da jabuticaba foi a CA 1162.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, H.; CHARPENTIER, C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hamp Shire v. 20, n. 1, p. 20-27, June 1998.

AMARAL, A. K. **SELEÇÃO DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* para produção da bebida fermentada de jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba*)**. 2004. 128 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

AMOURY, D. E.; DUFOUR, J. P.; ROUXHET, P. G. Flocculence of brewery yeasts and their surface properties: chemical composition, electrostatic charge and hydrofobicity. **Journal of Institute of Brewing**, London, v. 94, n. 1, p. 79-84, 1988.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analyses of the Association of Official Analytical Chemists** – 15 ed. Arlington, AOAC. 1990.

AVAKYANTS, S. P.; RASTYANNIKOV, E.G.; CHERNAYAGA, B. S.; NAVROSTSKII, V. J. Khromato-mass-spektrometricheskoe issledovanie letuchikh vesnchestv vina. **Vinodel. Vinograd.**, Moscow, v. 41, n. 1, p. 50-53, 1981.

BERTHEL, N. J.; OTERO, R. R. C.; BAUER, F.F.; THEVELEIN, J. M.; PRETORIUS, I. S. Discrepancy in glucose and fructose utilization during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, n. 4, p. 683-689, Feb. 2004.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. GOODAY, G. W. **The fungi**. 2<sup>a</sup> ed. California: Academia Press, 2001. p. 558

CASTELLARI, M.; VERSARI, A.; SPINABELLI, U.; GALASSI, S.; AMATI, A. An improved HPLC method for the analysis of organic acids, carbohydrates and alcohols in grape musts and wines. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**. New York, v. 23, n. 13, p. 2047-2056, 2000.

CHINNICI, F.; SPINABELLI, U.; RIPONI, C.; AMATI, A. Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid

chromatography. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 18, n. 2-3, p. 121-130, Mar/May 2004.

CORAZZA, M. L.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 449-452, July/ Aug. 2001.

CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. HPLC/UV determination of organic acids in fruit juices and nectars. **European Food Research Technology**, New York, v. 214, n. 1, p. 67-71, Jan. 2002.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; LIMA, L. C. O. Metodologia para elaboração de fermentado de cajá (*Spondias mombin* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 342-350, set./dez. 2003.

FERRAZ, V. **Cromatografia líquida de alta eficiência**. Viçosa: UFV. 2001, 33 p.

FERREIRA, D. F. **SISVAR – Sistema de análise de variância para dados balanceados**: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos, versão 4.3. Lavras: UFLA / DEX, 2000.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 1-2, p. 11-22, Sept. 2003.

GARRUTI, D.S.; FRANCO, M. R. B.; CASIMIRO, A. R. S.; ABREU, F. A. P. Efeito da suplementação do mosto e da linhagem de levedura na composição de voláteis e no sabor do fermentado de caju. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 33, n. 2, p. 85-92, 2002.

GIUDICI, P.; ZAMBONELLI, C.; KUNKEE, R. E. Increased production of n-propanol in wine by yeast strains having an impaired ability to form hydrogen sulfide. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 44, n. 1, p. 17-21, 1993.

HOLCROFT, D.; KADER, A. A. Controlled atmosphere-induced changes in pH and organic acid metabolism may affect color of stored strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**. Amsterdam, v. 17, n. 1, p. 19-32, Sept. 1999.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas: métodos químicos e físicos de alimentos**. 2<sup>a</sup> ed., São Paulo, v. 1, 1997. 371 p.

KOTANI, A.; MIYAGUCHI, Y.; TOMITA, E.; TAKAMURA, K.; KUSU, F. Determination of organic acids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection during wine brewing. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 6, p. 1440-1444, Mar. 2004.

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

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

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**. 4 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1996.

OLIVEIRA, A. L., BRUNINI, M. A., SALANDINI, C. A. R., BAZZO, F. R. Caracterização tecnológica de jaboticabas “Sabará” provenientes de diferentes regiões de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n. 3, p. 397-400, Dez. 2003.

OUGH, C. S. **Tratado básico de enología**. Tradução de Concepción Llaguno Marchena e Maria Dolorez Cabezudo Ibañes. Zaragoza: Acribia, 1996. 294 p. Tradução de: Winemaking basics. New York: Haworth Press, 1992.

RAPP, A.; MANDERRY, H. Wine aroma. **Experientia**, Basel, v. 42, n. 8, p. 873-884, Aug. 1986.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos – métodos químicos e biológicos**. Viçosa, UFV, Imprensa universitária, 1981. 166 p.

SUÁREZ-LUQUE, S.; MATO, I; HUIDOBRO, J. F.; SIMAL-LOZANO, J.; SANCHO, M. T. Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 955, n. 2, p. 207-214, May 2001.

WOOF, J. B. An approach to yeast sedimentation characteristics. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 68, p. 315-317, 1962.